

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INFLUENCIA DE B-GLUCANOS Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA RESPUESTA
INMUNE DEL BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*) (RAFINESQUE, 1818) EN
INFECCIONES CON *Ligictaluridus floridanus* (MUELLER, 1936)
(ANCYROCEPHALIDAE)

Por

FLAVIANO BENAVIDES GONZÁLEZ

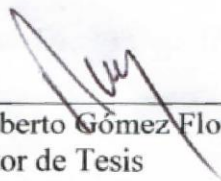
Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Septiembre, 2015


INFLUENCIA DE B-GLUCANOS Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA RESPUESTA
INMUNE DEL BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*) (RAFINESQUE, 1818) EN
INFECCIONES CON *Ligictalurus floridanus* (MUELLER, 1936)

(ANCYROCEPHALIDAE)

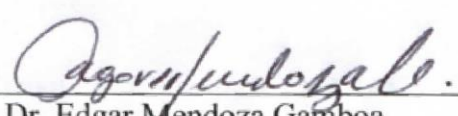
Comité de Tesis



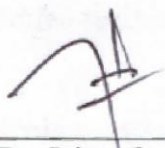
Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director de Tesis



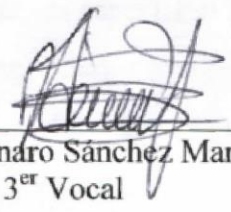
Dra. Patricia Tamez Guerra
Secretaria



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
1^{er} Vocal



Dr. Jaime Luis Rábago Castro
2^o Vocal



Dr. Jesús Genaro Sánchez Martínez
3^{er} Vocal

AGRADECIMIENTOS

A Dios, todo lo puedo a través de Él que me fortalece.

Al Dr. Jaime Luis Rábago Castro, por creer en mí, por la oportunidad e invitación para colaborar en este proyecto, por impulsarme a buscar la perfección académica y personal en cada aspecto de la vida.

Al Dr. Jesús Genaro Sánchez Martínez y al Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores, por compartir sus conocimientos y su experiencia profesional para fortalecer este trabajo con calidad internacional.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra y al Dr. Emilio Mendoza Gamboa por aceptar integrar mi comité de tesis y por sus oportunas observaciones y sugerencias a este manuscrito.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas por brindarme los espacios y la oportunidad de sacar adelante este proyecto a través de ellas.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa para el Desarrollo del Personal Docente (PRODEP) de la Universidad Autónoma de Tamaulipas por las becas y el apoyo económico recibido durante el desarrollo de este proyecto.

Al Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Tamaulipas A.C. y al Sistema Producto Bagre de Tamaulipas, por contribuir a esta investigación con el aporte de ejemplares y apoyo con equipo técnico y de transporte, en especial al MC. Isidro Otoniel Montelongo Alfaro y al Dr. Héctor Hugo Gojon Báez, quienes siempre apoyaron incondicionalmente el desarrollo de esta investigación.

Al personal docente y técnicos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas quienes colaboraron en el proyecto y compartieron sus conocimientos para concluirlo satisfactoriamente, en particular a la Técnico Laboratorista María Dora López Aguilar, Dr. Roberto Pérez Castañeda, MIE Antonio Joel Ruiz Uribe, Dr. José Vázquez Villanueva, Dr. Hugo Brígido Barrios García y Dra. María Lorena Torres Rodríguez.

A los alumnos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ayudarme a concluir la etapa experimental de este estudio en especial al MVZ Itzel Annilú Martínez Bárcenas, MVZ Gilberto Rivas Zarazúa, César Octavio Rodríguez Manríquez, Juan Carlos Antonio Grimaldo Hernández.

DEDICATORIA

Este manuscrito está dedicado en especial a mi familia, a mi esposa MVZ Brenda Paulina Mosqueda Jaime y a mis hijos Andrés Humberto y Ana Lucía Benavides Mosqueda; durante estos últimos años, ellos realizaron sacrificios para impulsarme a terminar este proyecto; en especial, dejando a un lado nuestro tiempo en familia; gracias por darme la fuerza y motivación para seguir adelante.

A mis hermanos MVZ Héctor Benavides Gonzáles y al LAE Ricardo Morales Malo, a quienes les agradezco estar ahí siempre que los necesité, incondicionalmente apoyando; permitiéndome desarrollar satisfactoriamente este posgrado.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
NOMENCLATURA	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Acuacultura en México	3
2.2. Importancia de las enfermedades en los peces	3
2.3. Enfermedades parasitarias del bagre de canal	4
2.4. Sistema Inmune de los peces teleósteos	6
2.4.1. Órganos linfoides	7
2.4.2. Sistema inmune inespecífico	8
2.4.2.1. Factores humorales	8
2.4.2.2. Respuesta inflamatoria	13
2.4.2.3. Factores celulares	14
2.4.3. Sistema inmune específico	17
2.4.3.1. Factores humorales	17
2.4.3.2. Factores celulares	18
2.5. El estrés en los peces teleósteos	19
2.6. Uso de ácido ascórbico y β -glucanos en acuicultura	22
2.6.1. Ácido ascórbico o vitamina C	22
2.6.2. β -glucanos	25
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO GENERAL	29

5.1. Objetivos particulares.....	29
6. CAPITULO 1. EVALUACIÓN DE AGENTES ANTIPARASITARIOS EN INFECCIONES NATURALES DE <i>L. floridanus</i> EN EL BAGRE DE CANAL..	30
6.1. Resumen	30
6.2. Introducción.....	31
6.3. Material y métodos.....	33
6.3.1. Diseño experimental	33
6.3.1.1. Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del praziquantel como antiparasitario.....	33
6.3.1.1.1. Análisis estadístico	35
6.3.1.2. Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del peróxido de hidrógeno y metrifonato como antiparasitarios	36
6.3.1.2.1. Análisis estadístico	37
6.4. Resultados	38
6.4.1. Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del praziquantel como antiparasitario.....	38
6.4.2. Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del peróxido de hidrógeno y metrifonato como antiparasitarios	43
6.5. Discusión	48
6.5.1. Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del praziquantel como antiparasitario.....	48
6.5.2. Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del peróxido de hidrógeno y metrifonato como antiparasitarios	51
7. CAPITULO 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS B-GLUCANOS (1,3 / 1,6) Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA INMUNOESTIMULACIÓN DE JUVENILES DE BAGRE DE CANAL AL SER ADICIONADOS A UNA DIETA COMERCIAL DEL BAGRE DE CANAL, <i>Ictalurus punctatus</i>.....	54
7.1. Resumen	54
7.2. Introducción.....	55
7.3. Material y métodos.....	57
7.3.1. Diseño experimental	57
7.3.2. Tratamientos/alimentación	58
7.3.2.1. Preparación de dietas	58
7.3.3. Muestreo	59
7.3.4. Mediciones.....	60
7.3.4.1. En sangre	60
7.3.4.2. En órganos	62
7.3.5. Análisis estadístico	62
7.4. Resultados	64
7.4.1. Evaluar el efecto de los β -glucanos (1,3 / 1,6) en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, <i>Ictalurus punctatus</i>	64
7.4.2. Evaluar el efecto del ácido ascórbico en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, <i>Ictalurus punctatus</i>	71
7.5. Discusión	79

7.5.1. Evaluar el efecto de los β -glucanos (1,3 / 1,6) en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, <i>Ictalurus punctatus</i> .	79
7.5.2. Evaluar el efecto del ácido ascórbico en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, <i>Ictalurus punctatus</i> .	83
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	87
LITERATURA CITADA	89
APÉNDICES	105
A. Solución de Natt y Herrick	105
B. Hoja de Identidad <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	106
C. Método turbidimétrico de McFarland	107
D. Solución amortiguadora con fosfatos (PBS)	108
RESUMEN BIOGRÁFICO	109

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Prevalencia anual de especies de parásitos en granjas de bagres de canal, <i>I. punctatus</i> , en localidades de Tamaulipas en el ciclo 2009-2010.*	6
2. Uso de ácido ascórbico y β -glucanos como suplementos en especies acuícolas y su efecto contra patógenos o respuesta inmune.	24
3. Media \pm EE del tiempo de sobrevivencia de <i>Ligictaluridus floridanus</i> por arco branquial expresado en segundos inmerso <i>in vitro</i> en soluciones con praziquantel al utilizar solución salina (SS) (0.65%), agua destilada (DW) y agua de acuario (AW) como diluyentes.	38
4. Media \pm EE del número total de <i>Ligictaluridus floridanus</i> por arco branquial, contados 24 h posteriores al tercer baño del experimento <i>in vivo</i> en los grupos control y de tratamiento.....	41
5. Media \pm EE del tiempo de sobrevivencia de <i>Ligictaluridus floridanus</i> por arco branquial expresado en segundos inmerso <i>in vitro</i> en soluciones con metrifonato (Mtf) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al utilizar solución salina (SS) (0.65%), agua destilada (DW) y agua de acuario (AW) como diluyentes.	45
6. Parámetros hematológicos en tratamientos con β -glucanos (1,3 / 1,6); media \pm EE. Hematocrito (Ht) %, Proteínas plasmáticas totales (TP) g/100 mL, Hemoglobina (Hb) g/dL, Conteo de células blancas (WBC) células $\times 10^6$ /mL, Conteo de células rojas (RBC) células $\times 10^5$ /mL, Glucosa mg/dL, Hemoglobina corpuscular media (MCH) pg, volumen corpuscular medio (MCV) fL, Células fagocíticas en sangre reactivas a Nitroazul de tetrazolio (FCB/NBT) células/campo, Inmunoglobulina M (IgM) g/L, Índice bazo-	

somático (SSI), Índice nefro-somático (NSI), Tejido de impronta de bazo reactivo a Nitroazul de tetrazolio (NBT/bazo), Tejido de impronta de riñón anterior reactivo a Nitroazul de tetrazolio (NBT/RA).....	65
7. Parámetros hematológicos en tratamientos con ácido ascórbico; Media \pm EE. Hematocrito (Ht) %, Proteínas plasmáticas totales (TP) g/100 mL, Hemoglobina (Hb) g/dL, Conteo de células blancas (WBC) células x 10^6 /mL, Conteo de células rojas (RBC) células x 10^5 /mL, Glucosa mg/dL, Hemoglobina corpuscular media (MCH) pg, volumen corpuscular medio (MCV) fL, Células fagocíticas reactivas al nitroblue tetrazolium (FC/NBT) células/campo, Inmunoglobulina M (IgM) g/L, Índice bazo-somático (SSI), Índice nefro-somático (NSI), Tejido de impronta de bazo reactivo a Nitroazul de tetrazolio (NBT/bazo), Tejido de impronta de riñón anterior reactivo a Nitroazul de tetrazolio (NBT/RA).	74
8. Escala de McFarland. Concentraciones para establecer la turbidimetría y su equivalencia en UFC bacterianas.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vista esquematizada de la dinámica del cortisol y catecolaminas en la producción de glucosa. (+) significa modulación positiva y (-) significa modulación negativa; adaptado y traducido de Martínez-Porchas et al. (2009).	21
2. Diferencias significativas ($p < 0.05$) indicadas por distintas letras entre grupos al administrar 10 mg/L de praziquantel. (A) Media expresada en segundos del tiempo de sobrevivencia de <i>Ligictaluridus floridanus</i> por arco branquial utilizando SS como diluyente en el experimento <i>in vitro</i> . (B) Media del número total de <i>Ligictaluridus floridanus</i> por arco branquial en el experimento <i>in vivo</i> , contados 24 h posteriores a la administración del tratamiento (10 mg/L). Data = $\text{Log}_{10} \pm \text{EE}$. N=3 por grupo.	39
3. Gráfico comparativo del tiempo de sobrevivencia de <i>Ligictaluridus floridanus</i> en arcos branquiales expuestos a praziquantel y solución salina (0.65%) (SS), agua destilada (DW) y agua de acuario (AW) como diluyentes y controles.	40
4. Comparación del tiempo de sobrevivencia parasitaria (<i>Ligictaluridus floridanus</i>) por arco branquial en segundos usando la prueba de Kaplan-Meier de proporción de sobrevivencia acumulada en el ensayo <i>in vitro</i>	42
5. Cantidad de parásitos (<i>Ligictaluridus floridanus</i>) por arco branquial (Media \pm EE) en los días de muestra del bioensayo <i>in vivo</i>	44
6. Gráficos comparativos del tiempo de sobrevivencia de <i>Ligictaluridus floridanus</i> en arco branquial utilizando el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier de proporción de sobrevivencia acumulada. (A) Tratamientos que utilizaron solución salina (0.65%) (SS) como diluyente; (B) tratamientos con	

agua destilada (DW) como diluyente; (C) tratamientos diluidos en agua de acuario (AW).....	47
7. Comparativo de dietas que utilizaron β -glucanos (1,3 / 1,6) al 0.5% (BG 0.5), 0.1% (BG 0.1) y 0.05% (BG 0.05) con la dieta control en el conteo leucocitario teñido con solución Natt-Herrick. Distintas letras indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre grupos.....	67
8. Actividad fagocítica del bagre de canal (<i>I. punctatus</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) utilizando dietas suplementadas con β -glucanos (1,3 / 1,6) (0.5, 0.1, 0.05%). (a) tasa fagocítica. (b) índice fagocítico. Distintas letras indican grupos homogéneos semanales estadísticamente diferentes ($p<0.05$).....	69
9. Comparativo de dietas que utilizaron ácido ascórbico a razón de 750 (AA 750), 500 (AA 500) y 250 mg/kg (AA 250) con la dieta control en el conteo leucocitario teñido con solución Natt-Herrick. Distintas letras indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre grupos.....	72
10. Actividad fagocítica del bagre de canal (<i>I. punctatus</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) utilizando dietas suplementadas con ácido ascórbico (750, 500, 250 mg/kg). (a) tasa fagocítica. (b) índice fagocítico. Distintas letras indican grupos homogéneos semanales estadísticamente diferentes ($p<0.05$).....	76
11. Valores del índice bazo-somático (SSI) semanales de la prueba Kruskal-Wallis en dietas de bagre de canal (<i>I. punctatus</i>) adicionadas con 250, 500 y 750 mg/kg de ácido ascórbico.....	77

NOMENCLATURA

mg	miligramos
L	litros
min	minutos
d	día
g	gramos
cm	centímetros
mL	mililitros
° C	grados Celsius
h	horas
mm	milímetro
pH	potencial de Hidrógeno
EE	error estándar
DE	desviación estándar
µm	micrómetro
β	beta
kg	kilogramo
EDTA	ácido etildiaminotetraacético
G	gravedades
µL	microlitros
mM	milimoles
ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	análisis de varianza
HSD	honest significant difference
α	alfa
dL	decilitros
pg	picogramos
fL	femtolitros
UFC	unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Ligictaluridus floridanus es un trematodo monogeneo, que parasita comúnmente las branquias de peces de agua dulce. En la acuicultura, los parásitos, causan pérdidas económicas considerables incluso la muerte de su huésped; una infestación parasitaria leve puede pasar desapercibida, pero aun así reducirá la eficiencia productiva. En el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Rafinesque, 1818) los parásitos pueden ocasionar serios problemas de mortalidad, en especial cuando el sistema inmune de los bagres está inmaduro. En México, Tamaulipas es un estado líder en producción de bagre de canal bajo sistemas controlados, representando una fuerte actividad económica que da empleo y sustento a muchas familias; en esta región *L. floridanus* tiene una prevalencia superior al 85% en las explotaciones tamaulipecas de bagre causando pérdidas económicas importantes. Este estudio evaluó la eficacia en bioensayos *in vitro* e *in vivo* de agentes antiparasitarios como el praziquantel (2, 5 y 10 mg/L) , metrifonato (0.25, 0.5 y 0.75 mg/L) y peróxido de hidrógeno (150, 300 y 570 mg/L) en el bagre de canal (*I. punctatus*) frente a infecciones naturales con *L. floridanus*, siendo el peróxido de hidrógeno el que tuvo una mejor eficacia contra el trematodo *L. floridanus* en concentraciones de 300 y 570 mg/L; reduciendo significativamente ($p<0.05$) el tiempo de sobrevivencia del parásito. Por otra parte, se evaluó la respuesta inmune no específica producida al bagre de canal (*I. punctatus*) por β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico (vitamina C) como complementos a una dieta comercial en concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.5 %; y 250, 500 y 750 mg/kg, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran una mejora del sistema inmunológico no específico entre la tercera y quinta semana de suplementación al ser usados en concentraciones de 0.05 % y 750 mg/kg, respectivamente; obteniendo diferencias significativas ($p<0.05$) al compararse contra la dieta control en el conteo de células blancas y en reacciones al nitroazul de tetrazolio causadas a las células fagocíticas sanguíneas, de bazo y de riñón anterior. Es necesario investigar la posible resistencia a infecciones parasitarias de *L. floridanus* al utilizar β -glucanos (1,3 / 1,6) o ácido ascórbico (vitamina C) en la dieta del bagre de canal (*I. punctatus*).

ABSTRACT

Ligictaluridus floridanus is a monogenean fluke, which commonly parasites gills of freshwater fish. In aquaculture, the parasite causes considerable economic loss or death of its host; a slight parasitic infestation may go unnoticed, but still reduces production efficiency. In the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Rafinesque, 1818), parasites can cause serious mortality problems, especially when catfish immune system is immature. In Mexico, Tamaulipas state is a leader in production of channel catfish under controlled systems, representing a major economic activity that provides employment and livelihood for many families; *L. floridanus* in this region has prevalence above 85% in Tamaulipas catfish farms causing major economic losses. This study evaluated the efficacy on *in vitro* and *in vivo* bioassays using antiparasitic agents such as praziquantel (2, 5 y 10 mg/L), metrifonate (0.25, 0.5 y 0.75 mg/L), and hydrogen peroxide (150, 300 y 570 mg/L) in channel catfish (*I. punctatus*) natural infected with *L. floridanus*. Hydrogen peroxide was shown to be effective against *L. floridanus* fluke at concentrations of 300 and 570 mg/L, significantly ($p < 0.05$) reducing the parasite survival time. Moreover, the nonspecific immune response produced by channel catfish (*I. punctatus*) was evaluated using β -glucans (1.3 / 1.6) and ascorbic acid (vitamin C) as complements to a commercial diet in concentrations of 0.05, 0.1 and 0.5 %; and 250, 500 and 750 mg/kg, respectively. The results showed an improvement of the non-specific immune system on the third and fifth weeks of supplementation when used in concentrations of 0.05% and 750mg/kg, respectively; obtaining significant differences ($p < 0.05$) when compared with the control diet in the white blood cell count and NBT reactions caused to blood, spleen and head kidney phagocytic cells. It is necessary to investigate possible resistance to parasitic infections of *L. floridanus* using β -glucans (1.3 / 1.6) or ascorbic acid (vitamin C) in the diet of channel catfish (*I. punctatus*).

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una de las tecnologías de mayor crecimiento en el mundo. Debido a este acelerado crecimiento y a la intensificación de los sistemas de cultivo, se han producido graves pérdidas por organismos patógenos.

Nuestro país representa una de las áreas con mayor biodiversidad en el mundo, e incluye una amplia gama de organismos parasitarios que pueden afectar la producción acuícola en general; los parásitos reportados en México abarcan 37 especies de trematodos adultos, 52 de metacercarias, 49 monogeneos, 15 cestodos adultos, 22 metacestodos, 7 acantocéfalos adultos y 65 nematodos. La mayoría de las explotaciones acuícolas intensivas tienen contacto o están dentro de cuerpos de agua donde comparten el espacio con especies de peces nativos que de una manera u otra han generado resistencia a ciertos organismos y que conviven en el mismo ambiente; en ocasiones los organismos pueden tener un mal manejo, y debido a sus altas densidades de población y a que son especies introducidas a un nuevo ambiente están sometidas a gran estrés fisiológico ocasionando en ellas una mayor susceptibilidad a enfermedades e inmunosupresión.

El bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818), es una especie que se encuentra en muchas partes del continente americano, sin embargo, a pesar de ser la misma especie, no se encuentra en el mismo medio, ni bajo las mismas condiciones de explotación y no convive con los mismos organismos patógenos, por ello, es necesaria la aplicación regional de estudios que permitan resolver problemáticas de salud locales.

Tamaulipas es el principal productor de bagre de canal bajo sistemas controlados a nivel nacional, y esta explotación representa una importante actividad económica en el sector privado y social, representando esta industria una fuente significativa de economía e ingresos para las personas que forman parte de esta cadena productiva. En estudios recientes se ha demostrado la elevada prevalencia parasitaria, principalmente del trematodo *Ligistalurus floridanus*, forzando a los productores a utilizar

excesivamente agentes químicos para su control. Este proyecto consistió en que mediante el empleo de prebióticos como los β -glucanos (1,3 / 1,6) y la vitamina C (ácido ascórbico) se estimulara la respuesta inmune del bagre de canal, como una nueva herramienta para el control de parásitos monogeneos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Acuicultura en México

La acuicultura representa una importante actividad económica a nivel mundial, constituyendo una fuente de obtención proteica como alternativa de alimentación. En México, los últimos datos oficiales de producción acuícola, reportan que la acuicultura ha alcanzado una producción de 146,782 toneladas, de la cual la gran mayoría la ocupa los cultivos de camarón, sin embargo existen otras especies también explotadas que son fuentes de empleo y sostén de muchas familias y comunidades y que contribuyen a la economía regional; tal es el caso de la explotación del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) que contribuye con 3,041 toneladas en la producción nacional, de las cuales 970 toneladas son bajo sistemas controlados (CONAPESCA, 2008).

Tamaulipas en 2009 alcanzó una producción de 1,021 toneladas de bagre de canal, repartidas en un padrón de 26 granjas de engorda y 6 unidades de cría, utilizando 96.5 Ha de espejo de agua, siendo considerado como uno de los principales productores nacionales (CESATAM, 2009).

2.2. Importancia de las enfermedades en los peces

Existe el antecedente, tanto en grandes como en pequeñas granjas acuícolas, del surgimiento de brotes de enfermedades (Hammond-Tooke *et al.*, 2012; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008), que causan severas consecuencias principalmente económicas para los dueños de las granjas, impactando los precios en los mercados regionales. También podemos encontrar enfermedades que si bien no causan la muerte inmediata de su hospedero, lo llevan a una pérdida de peso, ocasionando una mortalidad elevada dentro de las granjas y pérdidas económicas importantes. Es aquí donde se deben tomar medidas preventivas, desarrollando capacidades y facilidades para la detección particular de las necesidades de salud regionales (FAO, 2011).

Cuando se intensifica la producción de una especie animal, es inevitable que se presenten enfermedades y se deben tener en cuenta distintos factores para su prevención, tales como la especie explotada, su ambiente, el manejo y los patógenos presentes (Wendover, 2009).

En el bagre de canal, así como en la mayoría de los peces, se presentan dos tipos de enfermedades, las no infecciosas que no son causadas por organismos no vivos, donde podemos encontrar las enfermedades nutricionales, las relacionadas con el ambiente, las causadas por un mal funcionamiento fisiológico y las ocasionadas por productos tóxicos, y aquellas causadas por organismos vivos, como bacterias, hongos, virus o parásitos (Lee, 1995).

Debido a las grandes pérdidas económicas implicadas como consecuencia de una enfermedad, ya sea a causa de la mortalidad de los peces o del costo del tratamiento mismo; sin duda alguna, es mejor la prevención de las enfermedades (Wendover, 2009), ya que los tratamientos tradicionales como el uso de antibióticos o agentes químicos (Caipang *et al.*, 2012) muestran una tendencia a reducir su empleo a causa de la resistencia y a la acumulación de residuos tóxicos en el medio; es por eso que hay que contar con un buen manejo, adecuada sanidad, evitar el estrés en los peces, procurar su bienestar, y de preferencia inmunoestimularlos, ya que las enfermedades se desarrollan cuando se compromete el sistema inmune (Durborow, 2000).

2.3. Enfermedades parasitarias del bagre de canal

Los parásitos son organismos que viven dentro o adheridos al huésped; existen muchos tipos, internos y externos, desde los que pueden vivir dentro de las células sanguíneas y que son muy pequeños, hasta algunos que pueden medir 12.5 o 15 cm (Durborow, 2000).

Existen diversos tipos de parásitos que en la actualidad causan pérdidas económicas considerables, ocasionando hasta la muerte de su huésped; sin embargo, es posible que

una infestación parasitaria leve pase desapercibida pero por más mínima reducirá la eficiencia productiva (Lee, 1981). En el bagre de canal se pueden encontrar muchos grupos de parásitos diversos; estos llevan a serios problemas de mortalidad en la etapa de crecimiento de juveniles cuando el sistema inmune de los bagres no ha madurado; los grupos más comunes son los protozoarios como *Ichthyophthirius multifiliis* o “Ich”, *Trichodina* sp., *Chilodonella* sp., *Costia* sp., *Trichophyra* sp., *Scyphidia* sp., y *Epistylis* sp.; los cestodos o gusanos planos, los trematodos monogeneos como *Gyrodactylus* sp. y *Cleidodiscus* sp., o trematodos digeneos como *Alloglosidium corti*, entre otros (Hoffman, 1985).

Estudios recientes realizados en el estado de Tamaulipas, demuestran la elevada prevalencia parasitaria de las granjas de bagre de canal (Tabla 1) (Rábago-Castro, 2010).

Ligictaluridus floridanus es un trematodo monogeneo, es decir, que su ciclo de vida completo se realiza dentro de un solo hospedero. Los monogeneos se hallan comúnmente en la piel o en las branquias de peces de agua dulce, siendo esta última donde parasita *L. floridanus*; es un parásito ovíparo, es decir que sus larvas llamadas oncomiracidios emergen de un huevo; todos los monogeneos poseen un órgano para la fijación en su huésped llamado opisthaptor, el cual sirve para identificarlos y clasificarlos. En la acuicultura, los tratamientos más utilizados para su control son baños o inmersión de praziquantel, formalina, permanganato de potasio entre otros (Noga, 2000).

En Tamaulipas, *L. floridanus* es un parásito que tiene una alta prevalencia, debido a eso, se han desarrollado diversos estudios para conocer su impacto sobre la producción regional. Investigaciones recientes demuestran que *L. floridanus* causa un efecto negativo significativo en el peso de los bagres (*I. punctatus*) y en su consumo de alimento (Rábago-Castro *et al.*, 2014) Además, *L. floridanus* causa una infección aguda en el bagre de canal, que inicia en el día 3 post infección y alcanza su mayor nivel en el día 7 y comienza a descender en el día 9 (Montelongo-Alfaro *et al.*, 2012). Dicho

comportamiento sugiere que peces no infectados deben tratarse con inmunoestimulantes previo a su contacto con peces infectados para crear un tipo de resistencia a la infección.

Tabla 1

Prevalencia anual de especies de parásitos en granjas de bagres de canal,
I. punctatus, en localidades de Tamaulipas en el ciclo 2009-2010
 (Rábago-Castro, 2010).

E s p e c i e	Prevalencia (%)
<i>Ligictaluridus floridanus</i>	85.5
<i>Centrocestus formosanus</i>	27.0
<i>Henneguya exilis</i> (forma interlamelar)	16.4
<i>Diplostomulum</i> sp.	15.5
<i>Ergasilus cerastes</i>	11.9
<i>Corallobothrium</i> sp.	7.7
<i>Spiroxys</i> sp.	6.9
<i>Alloglosidium</i> sp.	3.0
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	2.7
<i>Henneguya</i> sp. (forma visible branquial)	0.9
<i>Henneguya southerlandi</i> (forma epitelial o tegumentaria)	0.9
<i>Trichodina</i> sp.	0.6
<i>Henneguya</i> sp. (sistema digestivo)	0.4
<i>Epistylis</i> sp.	0.3
<i>Henneguya adiposa</i> (forma en aleta adiposa)	0.2

2.4. Sistema inmune de los peces teleósteos

El sistema inmune de los vertebrados, al igual que en los peces teleósteos, permite combatir infecciones, garantizando así la sobrevivencia de los individuos dentro de su ambiente donde están continuamente propensos a infecciones de bacterias, virus, hongos y parásitos; esta susceptibilidad se incrementa cuando la salud de los peces es deficiente (Iwama and Nakanishi, 1996). En peces teleósteos, a diferencia de los mamíferos, no se lleva a cabo la formación de las células sanguíneas en la médula ósea, sino que ocurre en

distintos órganos, los cuales están relacionados con su sistema inmune, que se encuentra relativamente bien desarrollado y comparte muchas similitudes con el de los grandes vertebrados. El sistema inmune de los peces teleósteos se puede dividir en dos: el sistema inmune no específico, que es el natural o innato, y el específico o adquirido; en ellos participan elementos celulares o humorales (Aoki et al., 2008; Magnadottir, 2010; Milla *et al.*, 2011; Uribe *et al.*, 2011).

2.4.1. Órganos linfoides

El timo, el riñón anterior y el bazo son los principales órganos linfoides en los peces teleósteos; a diferencia de los mamíferos, los peces carecen de médula ósea y ganglios linfáticos, por lo que en riñón y bazo se localiza el tejido linfoide y el hematopoyético (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009; Kum and Sekkin, 2011).

El timo es un órgano par, bilateral, localizado por debajo del epitelio faríngeo y en la parte superior interna de las cámaras branquiales; es considerado como un órgano linfoide primario donde se producen linfocitos; se desarrolla antes que todos los tejidos linfoides y es el principal productor de linfocitos T. En los peces, este órgano va involucionando con la edad, al igual que en los mamíferos; en teleósteos jóvenes, el timo está recubierto por una capa de células epiteliales simples (Kennedy-Stoskopf, 1993; Olabuenaga, 2000).

El riñón anterior o cefálico, conocido también como pronefros, es el principal órgano hematopoyético de los peces y el principal productor de anticuerpos; aquí se lleva a cabo la diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos; la otra parte que resta del riñón es el riñón posterior o mesonefros cuya función principal es la excreción y filtración (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009). El riñón anterior contiene macrófagos que pueden fagocitar distintos antígenos, y es aquí donde aparecen células portadoras de inmunoglobulinas, precursoras de la IgM. El pronefros está formado por una red de fibras reticulares que le dan soporte, y cuyas células realizan las interacciones necesarias para la función de las células linfoides y las células endoteliales

del sinusoides; estas células son el principal sistema de filtrado de la sangre y además tienen una importante capacidad fagocítica (Ellis, 2001; Uribe *et al.*, 2011).

El bazo de los peces teleósteos, es un órgano principalmente linfoide, sin embargo, contiene un menor número de células hematopoyéticas; está formado por un sistema de elipsoides esplénicos que son capilares de paredes gruesas que se abren en la pulpa y resultan de la división de las arteriolas esplénicas. Está delimitado por una cápsula fibrosa y al contrario de los mamíferos, no se diferencia entre las pulpas roja y blanca; la pulpa roja está bien desarrollada y su función principal es la eritropoiesis y granulopoiesis, mientras que la pulpa blanca, está pobremente desarrollada y tiene elipsoides y melanomacrófagos (Rohlenová *et al.*, 2011; Uribe *et al.*, 2011). El tamaño del bazo de los teleósteos se ha utilizado comúnmente como un parámetro de potencial inmune, principalmente frente a infecciones parasitarias ya que existe un vínculo entre el tamaño del bazo del pez y su condición inmunológica (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009).

El bazo tiene un papel importante en cuanto a la memoria inmunológica, ya que es en este órgano donde usualmente se forman los anticuerpos los cuales son retenidos por largos periodos de tiempo; una característica importante del bazo de los peces teleósteos es que poseen macrófagos que tienen pigmentos de color oscuro, principalmente melanina, por lo cual, aquí se denominan melanomacrófagos que se encuentran agrupados dentro del bazo formando los centros melanomacrofágicos; estudios recientes demuestran una correlación entre el tamaño del bazo y el tamaño gonadal, proporcionando evidencia de la interacción entre el sistema inmune y el sistema esteroideal (Ellis, 2001; Milla *et al.*, 2011).

2.4.2. Sistema inmune inespecífico

2.4.2.1. Factores humorales

Como parte de los factores humorales que forman el sistema inmune no específico de los peces, podemos encontrar una serie de moléculas protéicas y células citotóxicas, mismas que son encontradas en los tejidos linfoides como el bazo y riñón anterior; éstas células tienen una función similar a los linfocitos granulares de los mamíferos, solo que éstos son agranulares (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009).

Además, de en los órganos ya mencionados la defensa humoral del sistema inmune no específico se encuentra en el mucus, suero y huevos de los peces y contienen una variedad de sustancias que inhiben de manera inespecífica el crecimiento de microorganismos infecciosos. Entre estas sustancias se encuentran la lisozima, el complemento, las lectinas, el interferón, la proteína c-reactiva y la transferrina (Aoki *et al.*, 2008; Fierro-Castro, 2009; Uribe *et al.*, 2011).

La barrera de defensa primaria entre el pez y su ambiente, está formada por los epitelios y el mucus. El mucus es una barrera externa adicional a la piel, que se encuentra presente en los peces, siendo secretada continuamente por la superficie integumental (Olabuenaga, 2000; Aoki *et al.*, 2008; Fierro-Castro, 2009). Además de las sustancias inhibitorias del crecimiento de organismos, el mucus atrapa físicamente e inhibe la colonización de microorganismos como bacterias en el epitelio y su producción se incrementa durante una infección; el mucus también se encuentra presente en el tracto gastrointestinal donde desarrolla la misma función protectora junto a enzimas proteolíticas (Kennedy-Stoskopf, 1993; Ellis, 2001; Rubio-Godoy, 2010).

Por otro lado, las proteínas de fase aguda aparecen por cortos periodos durante picos febriles, siendo las más importantes la transferrina y la proteína C reactiva (CRP) (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009).

La transferrina es una glicoproteína de forma globular con un amplio poder defensivo; es una molécula transportadora de hierro que se encuentra en el suero de la mayor parte de los vertebrados; cuando no está totalmente saturada posee propiedades antimicrobianas; esta glicoproteína compite con los patógenos invasores por el hierro endógeno, principalmente bacterias, afectando así su capacidad de reproducción y actuando como un bacteriostático (Uribe *et al.*, 2011).

La CRP actúa como una proteína de fase aguda, y suele tener una concentración uniforme y constante durante la vida de los peces, aunque diversos estudios sugieren que su concentración se incrementa luego de una infección bacteriana; además, protege al organismo al aglutinar ciertas bacterias y al interactuar con distintas moléculas del sistema inmune como el complemento y los receptores de los linfocitos (Olabeuena, 2000). La CRP también se produce en respuesta al estrés por lo que algunos autores sugieren su medición como indicador de estrés (Kennedy-Stoskopf, 1993; Fierro-Castro, 2009).

Otra de las moléculas que cuenta con propiedades antimicrobianas es la lisozima, la cual puede atacar la capa de peptidoglucanos presente en las paredes celulares de las bacterias. Específicamente cataliza la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, provocando su muerte por estrés osmótico; en peces, se ha encontrado en el suero, secreciones, mucus, membranas y tejidos ricos en leucocitos como el riñón anterior, bazo e intestino. Aparentemente, la principal fuente de lisozimas son los macrófagos y neutrófilos, siendo esta enzima la que desencadena la activación del sistema de complemento y las células fagocíticas (Ellis, 2001; Uribe *et al.*, 2011).

El sistema del complemento, al igual que la CRP, también se encuentra presente en suero y mucus, y está constituido por al menos veinte proteínas plasmáticas sintetizadas por proenzimas que se activan en cascada por una serie de reacciones enzimáticas (Olabeuena, 2000; Uribe *et al.*, 2011).

El sistema del complemento puede activarse de tres diferentes maneras; la vía clásica, que es la que se activa con la unión de un anticuerpo a la superficie de una célula; la alternativa, que es la que se activa independiente de los anticuerpos, sino que es activada por microorganismos extraños y la tercer vía que es dependiente de la lectina (Kennedy-Stoskopf, 1993; Fierro-Castro, 2009; Uribe *et al.*, 2011).

El sistema del complemento está compuesto por doce componentes que van del C1 al C9 y de los factores B, D y la properdina. La activación vía clásica se inicia por la activación del componente C1 y el complejo antígeno-anticuerpo, mientras que la activación vía alterna inicia por la activación del componente C3, activado por polisacáridos, lipopolisacáridos, zymozan y otros, los cuales están presentes en la pared celular de bacterias y hongos (Fierro-Castro, 2009).

La tercer vía de activación requiere de la interacción de lectinas con manosas y las ficolinas con restos de azúcares encontrados en la superficie de la pared celular de distintos microorganismos. Este sistema tiene un papel importante en la defensa del organismo contra parásitos monogéneos en el moco secretado por la piel, así como con la habilidad del suero de lisar parásitos gracias al complemento (Iwama and Nakanishi, 1996; Rubio-Godoy, 2007).

Las lectinas además han demostrado la reducción en la invasión del protozooario *Ichthyophthirius multifiliis* en tejidos de bagre de canal (Xu *et al.*, 2001). Otros estudios demuestran la estimulación de C3 y C4 al alimentar con algas antioxidantes en trucha arcoíris (Tort *et al.*, 2003; Emadi *et al.*, 2010).

Por otro lado, las citocinas actúan como moduladores del sistema inmune. Son glicoproteínas o polipéptidos encargadas de la comunicación intercelular, tales como las interleucinas (IL), los interferones (IFNs), el factor activador de macrófagos (MAF) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Olabuenaga, 2000).

Existen muchas interleucinas, nombradas con números que van desde el 1 al 34, las cuales están involucradas en distintos procesos de la respuesta inmune, principalmente en mamíferos. En los peces teleósteos se han estudiado, primordialmente la IL-1 β que está involucrada en regular la inmunidad a través de la estimulación de las células T, además junto con la IL-6 son las principales interleucinas envueltas en la respuesta inflamatoria; la IL-1 β ha sido estudiada en trucha arcoíris y en el salmón del Atlántico (Huising *et al.*, 2005). Además, se han descubierto nuevas interleucinas presentes en la respuesta inmune de los peces teleósteos como la IL-10, relacionada a la IL-4 o la IL-17 y la IL-22 que son estimuladas por el factor Th17 de las células T (Alaverdi *et al.*, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008).

El MAF puede producirse por la presencia de un antígeno o un agente extraño y sirve para que los macrófagos ejerzan sus funciones; el MAF puede activarse de dos maneras, la clásica o tipo I, que incluye el proceso denominado explosión respiratoria y que activa la producción de citocinas inflamatorias, y la alterna o tipo II, que es conocida como la vía de la arginasa ya que convierte la L-arginina en urea y juega un papel muy importante en la respuesta inmune adaptativa (Fierro-Castro, 2009).

Los IFNs son citocinas pH-resistentes, producidas por los macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células asesinas naturales (NK), que aparecen regularmente en el combate a infecciones virales o a una estimulación inmune. Actúan inhibiendo la replicación del ácido nucleico en las células infectadas; en los mamíferos existen descritas tres familias de IFN (tipo I, tipo II y tipo III), diferenciables por su estructura protéica y por sus propiedades funcionales; el interferón tipo I incluye al IFN- α y al IFN- β , los cuales, se unen a diferentes receptores resultando en la activación de genes que codifican para la síntesis de proteínas antivirales, tales como las proteínas MX y otras; en el salmón del Atlántico se han descrito dos tipos de IFN- α , 1 y 2. El IFN tipo II está representado por el IFN- γ producido por los linfocitos T y en respuesta a antígenos o IL-12 y 18, y contrario al IFN tipo I, reacciona principalmente ante infecciones bacterianas activando los macrófagos. El interferón tipo III está representado por el IFN- λ (Alvarez-Pellitero, 2008; Uribe *et al.*, 2011).

El TNF pertenece a una gran familia de proteínas estructuralmente relacionadas, compuestas por tres cadenas de proteínas iguales cuya forma determina su actividad; en mamíferos se han descrito y caracterizados dos formas de TNF, llamadas α y β , sin embargo, en los peces únicamente se conoce el TNF- α identificada en el lenguado japonés y en la trucha arcoíris (García-Castillo *et al.*, 2004). El TNF- α es una citocina producida durante la reacción inflamatoria aguda por los monocitos o macrófagos y juega un papel importante en cuanto a la mediación y resistencia contra infecciones parasitarias, bacterianas y virales, además, brinda al cuerpo resistencia contra los tumores (García-Castillo *et al.*, 2002). El TNF- α funciona interactuando con dos distintos receptores TNFR1 y TNFR2; el primero, es expresado en todos los tipos de células de los mamíferos, mientras que el segundo, solamente es expresado en células del sistema inmune y endotelial (Albalat *et al.*, 2005; Goodsell, 2006).

2.4.2.2. Respuesta inflamatoria

La inflamación es un proceso inespecífico que es parte de la respuesta inmune; es una reacción común en todos los mamíferos y en los peces teleósteos y surge como una respuesta protectora del tejido hacia un determinado daño, lesión o infección de patógenos como virus, bacterias o parásitos. La forma como la respuesta inflamatoria se produce es mediante una combinación de distintos mecanismos inespecíficos caracterizada por una serie de eventos: vasodilatación con incremento en el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular, exudación del plasma y migración leucocitaria hacia el área de lesión (Secombes *et al.*, 2001; Dotta *et al.*, 2011).

Las primeras células que llegan al lugar donde se está produciendo la reacción inflamatoria son los neutrófilos, por lo que una neutrofilia puede ser un indicador de inflamación aguda; los neutrófilos desarrollan una actividad extracelular al liberar enzimas y radicales libres. La observación de la inflamación en los peces teleósteos fue descrita por Mensill y data de 1985 con inyecciones de *Bacillus anthracis* en la cavidad visceral (Buchmann, 1999; Martins *et al.*, 2009).

Tras la llegada de los neutrófilos al sitio de lesión, aparecen los macrófagos, cuya función es fagocitar los restos de tejido dañado y desechos celulares; también llegan los eosinófilos y los basófilos; estas células en conjunto con los neutrófilos, contribuyen a la activación de citocinas como el TNF- α seguido de la IL-1 y la IL-6 (Holland *et al.*, 2002). Además cuando hay una infección bacteriana, los receptores celulares reconocen los peptidoglucanos de la pared celular bacteriana, por lo que se activa la migración celular; en el caso de una infección parasitaria, los linfocitos migran al lugar de la lesión ocasionada por el parásito y los macrófagos intentan encapsularlo formando regularmente granulomas. Como resultado de la activación de citocinas, se produce estrés en el animal, lo que lleva a la secreción de glucocorticoides y catecolaminas, mismas que limitan la respuesta inflamatoria reduciendo un daño mayor a los tejidos (Alvarez-Pellitero, 2008; Boltaña *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2011).

2.4.2.3. Factores celulares

Otra parte del sistema inmune no específico, es la comprendida por el sistema de defensa celular, en el cual están envueltos una serie de distintos tipos de leucocitos que responden principalmente a la reacción inflamatoria. Los factores celulares que forman parte del sistema inmune inespecífico son principalmente las células citotóxicas no específicas (NCC), equivalentes a las células NK en mamíferos y las células fagocíticas como los agranulocitos y granulocitos (Esteban *et al.*, 2012). Un ejemplo de reacción inflamatoria causada por los parásitos monogéneos se presenta por ejemplo con *Neoheterobothrium hirame*, cuando se adhiere a la pared de la cavidad branquial causando una fuerte reacción inflamatoria que envuelve al opistohaptor, ocasionando una fijación más segura y evitando el desprendimiento del mismo (Rubio-Godoy, 2010).

Las NCC son linfocitos agranulares que comúnmente podemos encontrar en el pronefros, bazo, timo y en menor cantidad en la sangre periférica; estas células, cuentan con distintos receptores para el inicio de una respuesta inmune; los receptores tipo toll y los receptores de las inmunoglobulinas. Las NCCs son un importante

mecanismo de defensa frente a infecciones parasitarias, principalmente con trematodos y frente a infecciones virales, y actúan lisando las células infectadas, causando un incremento en la respuesta inflamatoria al ocasionar la liberación de citocinas (Rubio-Godoy, 2010; Uribe *et al.*, 2011).

La fagocitosis es uno de los principales mecanismos de defensa celular involucrado en la respuesta protectora de los organismos frente a patógenos, donde los monocitos/macrófagos y leucocitos granulares eliminan el material extraño dentro del organismo de una manera inespecífica (Alvarez-Pellitero, 2008). Estas células, juegan un papel muy importante cuando los individuos intentan sobrevivir en condiciones adversas, ya que contrario a la producción de anticuerpos, no depende de la temperatura, sino de la capacidad de respuesta fagocítica del individuo (Fierro-Castro, 2009; Uribe *et al.*, 2011).

El proceso de la fagocitosis en los peces teleósteos es muy similar al de los vertebrados superiores; incluye etapas de reconocimiento y unión de una partícula extraña, incorporación a la membrana del fagocito, digestión de la o las partículas fagocitadas y destrucción del antígeno. El reconocimiento y atracción de las células fagocíticas hacia el microorganismo o partícula extraña, funciona a través de un proceso que se le conoce como opsonización, mismo que consiste en el recubrimiento de la partícula extraña con los factores séricos como el sistema de complemento, anticuerpos específicos y opsoninas inespecíficas (Magnadottir, 2010). El componente C3 del sistema de complemento, es el promotor más activo para la fagocitosis, dando lugar al inicio de la misma con la etapa de reconocimiento y unión a través de interacciones hidrofóbicas o interacciones azúcar/lectina entre la célula fagocítica y la pared bacteriana u otras partículas (Fierro-Castro, 2009; Rubio-Godoy, 2010).

Gracias a la capacidad de resistencia de los microorganismos o a la deficiente capacidad microbicida del organismo, la fagocitosis no siempre culmina con la digestión del agente extraño, sin embargo, debe recalcar que este es el objetivo final; por ejemplo, estudios *in vitro* demuestran que *Edwardsiella ictaluri* tiene la

capacidad de sobrevivir a la fagocitosis y además puede multiplicarse dentro de los macrófagos (Kennedy-Stoskopf, 1993; Magnadottir, 2010).

Los monocitos/macrófagos son células mononucleares móviles restringidas a la circulación periférica, generalmente son de mayor tamaño que otros leucocitos. Sólo se ha demostrado su presencia en algunas especies teleósteas en sangre y riñón; gracias a su tamaño pueden fagocitar partículas más grandes (Kennedy-Stoskopf, 1993; Olabuenaga, 2000).

En la clasificación de leucocitos granulares o granulocitos se incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Éstas son células móviles cuyo citoplasma contiene gránulos lisosomales entre otros organelos, y que dependiendo de la especie, es la proporción con la que se les puede encontrar en la sangre, siendo los más comunes los neutrófilos y eosinófilos (Kennedy-Stoskopf, 1993; Olabuenaga, 2000).

Además de la capacidad fagocítica, los fagocitos cuentan con diferentes mecanismos destructores que se pueden medir y que han servido como indicadores de actividad fagocítica, siendo los más comunes, el mecanismo oxidativo de la explosión respiratoria (RB) y el de la producción de óxido nítrico (NO). La RB se caracteriza por la producción de metabolitos reactivos del oxígeno (ROS) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso que actúan de una manera microbicida intra o extracelularmente, sin que esto afecte el proceso. La reacción de NO con oxígeno genera radicales libres oxidantes como los iones de NO^+ , dióxido de nitrógeno (NO_2), nitrosotioles y peroxinitritos (ONOO^-); la producción de NO está regulada por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); esta enzima, representa un factor importante en la respuesta inmune y está regulada por citocinas como el IFN y el TNF. Esta reacción juega un papel muy importante en la defensa celular contra los parásitos y frente a infecciones bacterianas y virales (Alvarez-Pellitero, 2008; Fierro-Castro, 2009; Rubio-Godoy, 2010).

2.4.3. Sistema inmune específico

El sistema inmune específico de los peces se divide también en dos partes: humoral y celular (Ganner and Schatzmayr, 2012).

2.4.3.1. Factores humorales

La defensa humoral del sistema inmune específico es la que provee inmunidad y resistencia a los peces cuando son expuestos a agentes extraños, tales como parásitos o bacterias. Aquí las inmunoglobulinas (Igs) y las células B tienen un papel muy importante formando anticuerpos (Ac). La defensa humoral específica inicia con las células presentadoras de antígenos (APCs); estas células, actúan en una red compleja de interacciones mediante un proceso denominado complejo principal de histocompatibilidad (MHC), mismo que puede iniciar con el reconocimiento de partículas extrañas por parte de los monocitos/macrófagos en la fagocitosis a través de células dendríticas y los linfocitos B (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009).

Los linfocitos B, con ayuda de los monocitos/macrófagos en el proceso de presentación antigénica, son transformados en células plasmáticas, las cuales se encuentran en el tejido conectivo, sangre, bazo y riñón; estas células son activadas por antígenos y son consideradas como las principales productoras de Igs (Olabuenaga, 2000).

A diferencia de los vertebrados superiores, donde se han encontrados muchos tipos de Igs, en los peces teleósteos y cartilaginosos, solo se ha documentado la existencia de la IgM en mayor cantidad, aunque también se conoce la presencia de IgD, IgT e IgZ. Del contenido protéico total en el suero sanguíneo, un 40-50% está representado por Igs; mismas que se encuentran organizadas de igual manera que en los vertebrados superiores ya que se pueden encontrar en la gran mayoría de los fluidos tisulares gracias a la permeabilidad de los vasos sanguíneos como en el plasma, linfa y mucus epitelial. Existe evidencia de que la infección por parásitos monogéneos

(*Dactylogyrus vastator* y *D. extensus*) ocasiona el desarrollo de inmunoglobulinas en carpas (Alvarez-Pellitero, 2008), y en la trucha arcoíris está documentada la producción de anticuerpos contra *Heterobothrium okamotoi* (Iwama and Nakanishi, 1996; Evenhuis *et al.*, 2007; Rubio-Godoy, 2007).

A diferencia de los mamíferos, los peces teleósteos cuentan con una baja cantidad de anticuerpos, sin embargo, tienen igual importancia, ya que cuando un antígeno es reconocido la primera vez por el organismo, desencadena un fenómeno conocido como memoria inmunológica; este fenómeno permite una rápida y mayor producción de anticuerpos tras una segunda exposición al mismo antígeno. Esta memoria inmunológica es usada como el principio fundamental en la aplicación de vacunas, tanto en mamíferos como en teleósteos. Se han desarrollado diversas vacunas para el uso acuícola a gran escala, principalmente contra patógenos bacterianos, tal como *E. ictaluri*; sin embargo, también existen algunas vacunas contra agentes virales y en fase experimental se han desarrollado vacunas contra algunos parásitos monogéneos (Rubio-Godoy, 2010; Morera and MacKenzie, 2011; Uribe *et al.*, 2011).

La respuesta específica humoral, es un proceso lento y depende en gran parte de los cambios estacionales y la temperatura; debido a que cada especie de pez cuenta con condiciones óptimas para su desarrollo, dependiendo de su ambiente natural, en general, mientras más alta sea la temperatura dentro del rango fisiológico normal, más corta es la fase de inducción y más alta es la respuesta inmune y viceversa (Olabuenaga, 2000; Fierro-Castro, 2009).

2.4.3.2. Factores celulares

La inmunidad celular específica está mediada principalmente por los linfocitos T y sus diferentes clones producidos en el timo; son células fagocíticas relativamente pequeñas que poseen un núcleo redondo oval cuyo tamaño oscila entre los 4.5-8 μm y constituyen el 50 – 80% del total de los leucocitos; este tipo de inmunidad depende de que las células del MHC sean capaces de presentarles antígenos a los

linfocitos T, siendo efectiva contra patógenos intracelulares como virus, que generalmente, escapan al sistema inmune humoral, y que para realizar su papel destruyen la célula donde se encuentra el microorganismo patógeno (Kennedy-Stoskopf, 1993; Olabuenaga, 2000; Rubio-Godoy, 2010).

2.5. El estrés en los peces teleósteos

La expansión y modernización de la industria acuícola ha llevado al límite las explotaciones de peces, ya que al buscar incrementar la rentabilidad, intentando producir más toneladas en menos espacio, lleva a los peces a situaciones de estrés por la competencia en el alimento y espacios, favoreciendo a la presencia de enfermedades infecciosas (Corredor and Landines, 2009; Shoemaker *et al.*, 2003). En el medio natural, las situaciones de estrés se presentan de una manera distinta, a la huida de algún depredador, al tener un ambiente contaminado o de pobre calidad de agua, sin embargo, fisiológicamente se originan las mismas respuestas en el pez (Auro-de-Ocampo and Ocampo-Camberos, 1999; Flores-Quintana, 2002; Van der Salm *et al.*, 2002; Rábago-Castro, 2010).

El estrés se define como la suma de todas las respuestas fisiológicas en un organismo ocasionadas por la pérdida del equilibrio dinámico u homeostasis, a causa de agentes estresantes externos o internos; estas respuestas fisiológicas incluyen una serie de reacciones bioquímicas que pretenden que el individuo logre adaptarse a una nueva situación (Auro-de-Ocampo and Ocampo-Camberos, 1999; Corredor and Landines, 2009).

Existen dos tipos de situaciones estresantes, las agudas o letales, que son las que ocurren de una manera rápida y las crónicas o subletales que generalmente son las más comunes y que en sus inicios son indetectable, ya que los principales cambios ocurren dentro del organismo como respuesta a situaciones continuas o periódicas de exposición a agentes estresantes. El estrés crónico a su vez puede subdividirse en dos tipos: directo e indirecto, siendo los directos los que afectan metabólicamente los componentes

funcionales celulares, tales como enzimas o membranas o que afectan directamente la respiración, circulación, respuesta inmune, osmorregulación o regulación hormonal; los indirectos son aquellos en los que se modifican actividades conductuales, tales como la alimentación, reproducción y capacidad de competencia (Auro-de-Ocampo and Ocampo-Camberos, 1999).

Los estímulos estresantes activan distintas respuestas fisiológicas en los organismos, como lo es el eje hipotálamo-simpático-cromafín y el eje hipotálamo-hipofisario-interrenal; en el primero se liberan catecolaminas y en el segundo se aumentan los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) para estimular la liberación de cortisol (Corredor and Landines, 2009; Martínez-Porchas *et al.*, 2009) (Figura 1).

Resulta imposible determinar cuantitativamente la fuerza o magnitud de un estímulo estresante, ya que esto va a depender en gran medida de la capacidad de adaptación de los individuos a la nueva situación. Por ello se han desarrollado diversas metodologías para la medición de estrés en los organismos basadas en las reacciones fisiológicas causadas en el animal (Auro-de-Ocampo and Ocampo-Camberos, 1999; Flores-Quintana, 2002).

En los peces teleósteos, la reacción ante el estrés consta de dos fases, la primera es una fase corta donde se incrementa el nivel de las catecolaminas en el plasma liberadas por las células cromafines del riñón y la segunda, que generalmente es una fase larga y prolongada en la cual se incrementan los niveles de cortisol en el plasma (Flores-Quintana, 2002; Pankhurst, 2011).

El hipotálamo es una glándula secretora de hormonas peptídicas que favorecen la liberación o inhiben diversas hormonas en la hipófisis; una de esas hormonas es la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), encargada de regular la liberación y síntesis de adrenocorticotrofina (ACTH); una de las funciones de esta hormona es regular los niveles de glucocorticoides provenientes de la glándula interrenal. Los altos niveles de ACTH liberados rápidamente en la fase aguda de la respuesta al estrés, se

encuentran relacionados con el incremento de los niveles de cortisol en plasma y con los altos niveles de glucosa proveniente del glicógeno hepático (Pankhurst, 2011). Gracias al conocimiento de la dinámica hormonal post-estrés, ha sido posible obtener valores de diversas hormonas como resultado de un estímulo estresante, y que comúnmente son utilizadas las mediciones de cortisol en el plasma y de glucosa sanguínea (Evans, 2003; Toa *et al.*, 2004; Barandica and Tort, 2008).

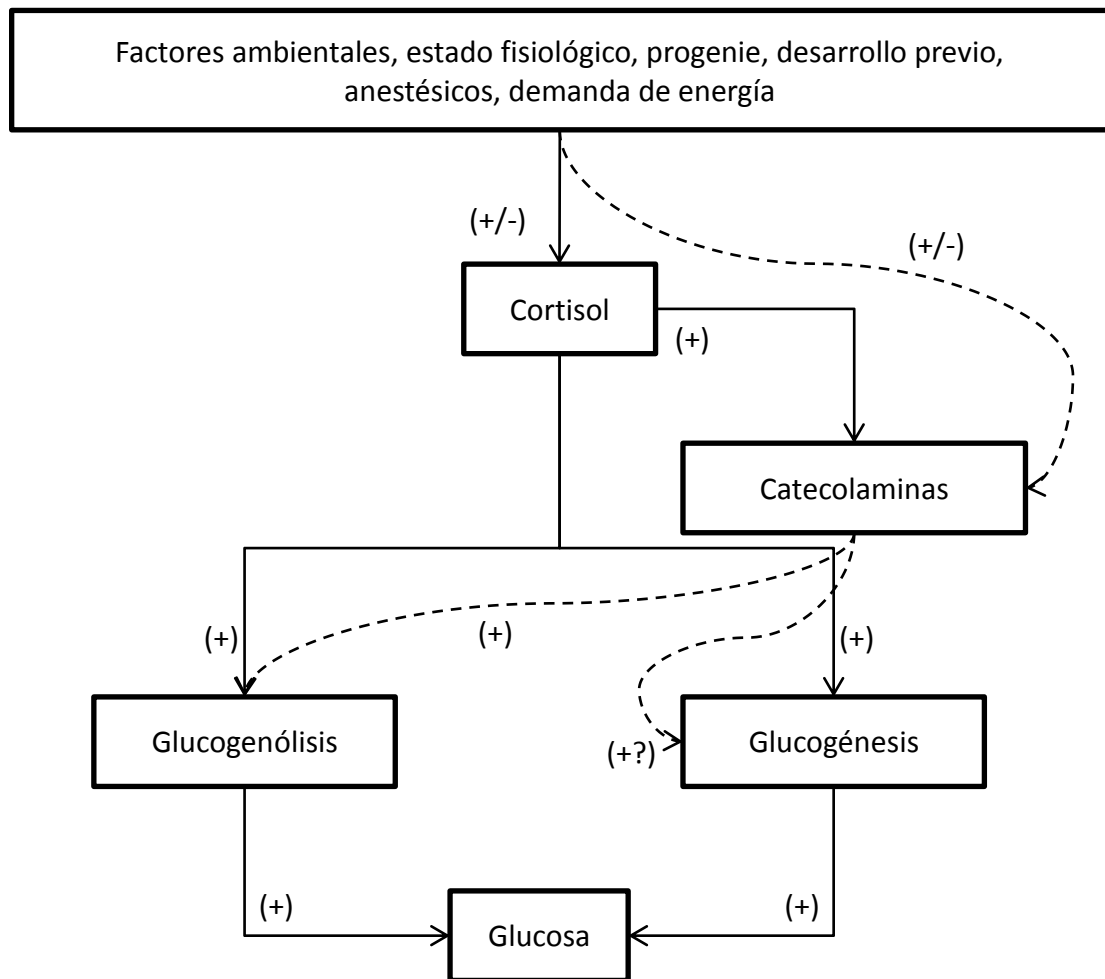


Figura 1. Vista esquematizada de la dinámica del cortisol y catecolaminas en la producción de glucosa. (+) significa modulación positiva y (-) significa modulación negativa; adaptado y traducido de Martínez-Porchas *et al.*, (2009).

Con el estudio del comportamiento de los peces ante situaciones de estrés se ha desarrollado una amplia gama de posibilidades en el campo de la investigación

científica, siendo ello muy importante debido a las alteraciones causadas por el estrés en los organismos, a la predisposición de los mismos a enfermedades post-estrés o a la reducción de parámetros reproductivos en las granjas de cría (Kittilsen *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2011).

Algunos compuestos como las vitaminas C (Lim *et al.*, 2001) y E (Montero *et al.*, 2001), hierro (Barros *et al.*, 2000) y antioxidantes adicionados en la alimentación favorecen la adaptación de los peces a las situaciones de estrés. Otros pueden actuar como prebióticos inmunoestimulando la flora microbiana del organismo para protegerlo de infecciones y evitar la susceptibilidad a enfermedades o a invasiones parasitarias (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008), β -glucanos (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011), gosypol (Yildirim *et al.*, 2003), zinc (Lim *et al.*, 1996) y otros (Nolan *et al.*, 2003; Schreck, 2010; Hammond-Tooke *et al.*, 2012).

2.6. Uso de ácido ascórbico y β -glucanos en acuicultura

Actualmente, la acuicultura representa una actividad económica que crece rápidamente gracias al desarrollo de la producción intensiva, sin embargo, esto implica grandes problemas de sanidad debido al estrés generado por el poco espacio disponible para cada uno de los animales y las malas prácticas de manejo dentro de las granjas. Aun cuando se ha desarrollado un buen control químico para evitar las enfermedades, éstas continúan afectando al sector productivo, llevando al desarrollo de terapias alternas al control químico o tratamientos preventivos que refuercen el sistema inmune de los peces, ayudando así a reducir la intensidad de las enfermedades o incluso su aparición (Ronsón-Paulín and Medina-Reyna, 2002; Galina *et al.*, 2009).

2.6.1. Ácido ascórbico o vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) ($C_6H_8O_6$) es una vitamina hidrosoluble, esencial en la mayoría de los peces para un crecimiento y funcionamiento fisiológico normal; es un nutriente implicado en varias reacciones naturales como la hidroxilación,

la síntesis de colágeno, la formación de glóbulos rojos y el buen funcionamiento del sistema inmune, sin embargo su concentración dentro del organismo disminuye bajo situaciones de estrés (Li and Lovell, 1985; Ibiyo *et al.*, 2007; Corredor and Landines, 2009).

Los peces teleósteos no son capaces de sintetizar el AA por lo que deben obtenerlo en la ingesta diaria (Corredor and Landines, 2009), lo contrario causa el desarrollo de enfermedades como lordosis, sifosis, escoliosis, deformidades, anormalidades oculares, lenta recuperación de heridas y reducción de la eficiencia reproductiva (Lovell, 1973; El Naggar and Lovell, 1991; Metwally and Fouad, 2009); además el AA protege al organismo contra radicales libres (Farahi *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2012).

Desde hace tiempo se ha documentado que la vitamina C mejora el crecimiento y la respuesta inmune y producción de anticuerpos de los peces que la consumen (Tabla 2) (Li and Lovell, 1985; Sealey and Gatlin, 2002). En el bagre de canal, *Ictalurus punctatus* se requieren al menos 25-60 mg/kg de alimento de AA para el crecimiento y desarrollo óptimo, lo cual evita anormalidades como la escoliosis (Andrews and Murai, 1975; Lim and Lovell, 1978); otros autores reportan que un aumento en la dosis de vitamina C hasta los 139 mg/kg en la dieta de otras especies de peces, inclusive incrementa la resistencia contra los parásitos monogeneos *Anacanthorus penilabiatu*s (Martins, 1998); en carpas (*Ctenopharyngodon idellus*); además, elevadas concentraciones de AA mejoran la motilidad, viabilidad y concentración espermática (Metwally and Fouad, 2009).

Tabla 2

Uso de Ácido ascórbico y β -glucanos como suplementos en especies acuícolas y su efecto contra patógenos o respuesta inmune.

Suplemento	Dosis	Especie	Efecto	Referencia
Vitamina C (L-AA)	1500 mg/kg 3000 mg/kg	Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	(-) deformidades espinales; (+) capacidad antioxidante	Bai and Gatlin, 1992
Vitamina C (ascorbato sódico)	3 g/kg	Dorada (<i>Sparus auratus</i>)	(+) capacidad de reacción frente a una posible infección viral o protozoaria y frente a tumores	Cuesta <i>et al.</i> , 2002
AA	1000 mg/kg 5000 mg/kg	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	(+) resistencia a estrés y enfermedades; (+) RBA; (+) PA	Ishikawa <i>et al.</i> , 2011
L-ascorbil-2-monofosfato	60 mg/kg 120 mg/kg	Anguila (<i>Anguilla japonica</i>)	(+) WG; (+) SGR; establece la dosis de 41.1-43.9 mg/kg para juveniles de anguila	Bae <i>et al.</i> , 2012
Vitamina C (L-AA)	1000 y 2000 mg/L/3hr	Pez angel (<i>Pterophyllum scalare</i> Schultze, 1823)	(+) tolerancia al estrés por alta temperatura	Farahi <i>et al.</i> , 2011
AA	500 mg/kg 2000 mg/kg	Bagre asiático (<i>Clarias batrachus</i>)	(+) SGR; (+) SOP; (+) MPO; (+) ACA; (+) resistencia a infección con <i>A. hydrophila</i>	Kumari and Sahoo, 2005
Vitamina C	200 mg/100g	Tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	(+) en la capacidad de atenuar el daño por insecticida organofosforado	Özkan <i>et al.</i> , 2012
L-ascorbil-2-polifosfato	50 mg/kg 3000 mg/kg	Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	(-) deformidades; (+) migración fagocitaria; SA frente a desafío con <i>Edwardsiella ictaluri</i>	Lim <i>et al.</i> , 2000
Ascorbato-2-sulfato (AS)	500 mg/kg 5000 mg/kg	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	No se detectó equivalencia de AS como fuente de Vit. C	Sandnes <i>et al.</i> , 1990
Vitamina C (AA)	1000 mg/kg	Carpa de la India (<i>Labeo rohita</i>)	(+) SGR; (+) RBA; (+) PA	Tewary and Patra, 2011
Vitamina C (L-AA)	50 mg/kg	Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Determinó los requerimientos de AA de la especie	Andrews and Murai, 1975
Vitamina C (L-AA)	100 mg/kg	Vundu (<i>Heterobranchus longifilis</i>)	Determinó los requerimientos de AA de la especie	Ibiyo <i>et al.</i> , 2007
Vitamina C (AA)	300 mg/kg 3000 mg/kg	Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	(-) mortalidad por <i>E. ictaluri</i> ; (+) AP; (+) ACA	Li and Lovell, 1985
AA	139 mg/kg	Pez chato (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	(+) resistencia al parásito monogeneo <i>Anacanthorus penilabiatus</i>	Martins, 1998
Vitamina C (L-AA)	1000 mg/kg	Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idellu</i>)	(+) concentración y motilidad espermática; (+) fertilización	Metwally and Fouad, 2009
Vitamina C (L-AA)	60 mg/kg	Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Determinó los requerimientos de AA de la especie	Lim and Lovell, 1978
β -glucanos + Vit-C	-	Trucha	(+) ACA; (+) RQL	Kum and Sekkin, 2011
β -1,3/1,6 glucanos	250 ppm	Robalo de mar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	(+) RBA; SA LA	Bonaldo <i>et al.</i> , 2009
β -glucanos	0.2%	Pepino de mar (<i>Apostichopus japonicus</i>)	(+) parámetros inmunológicos (-) morbilidad con <i>V. splendidus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2010
β -1,3glucanos	5.0%	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	(-) infestación con <i>Ichthyophthirius multifirris</i>	Mohammad <i>et al.</i> , 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.1%	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	(+) WG en una dieta de 40% de PC	Lara-Flores <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5% 1.0%	Lenguado japonés (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	(+) crecimiento; (+) SGR	Liu <i>et al.</i> , 2012

Tabla 2. (Continuación)

Suplemento	Dosis	Especie	Efecto	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0%	Langostino de agua dulce (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	SA en SGR, crecimiento y sobrevivencia; (+) RBA; (+) sobrevivencia frente al virus <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Parmar <i>et al.</i> , 2012
β -1,3glucanos de <i>Laminaria digitata</i>	500 mg/kg 1000 mg/kg	Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	(-) en mortalidad frente al desafío con altos niveles de nitritos	Zhao <i>et al.</i> , 2012
β -1,3/1,6 glucanos de <i>S. cerevisiae</i>	0.2% 0.3%	Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	(+) PA; (+) PI; mejora los monocitos sanguíneos	Zhu <i>et al.</i> , 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20% de la proteína	Robalo de mar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	(-) enzimas oxidativas (SOD y catalasa); recomendación como antioxidante	Santacroce <i>et al.</i> , 2012

(+): Incremento; (-): Decremento; Ácido Ascórbico (AA); SA: Sin Actividad; RBA: Actividad de la explosión respiratoria; LA: Actividad del lisozima; PA: Actividad fagocítica; WG: Ganancia de peso; SGR: Tasa de crecimiento específica; PC: Contenido protéico; SOP: Producción superóxido; MPO: Mieloperoxidasa; ACA: Actividad alternativa del complemento; PI: Índice fagocítico de los leucocitos; SOD: Dismutasa superóxido; AP: Producción de anticuerpos; RQL: Respuesta quimiolumincente.

2.6.2. β -glucanos

Los β -Glucanos son polisacáridos formados por moléculas de glucosa obtenidos principalmente de las paredes celulares de levaduras y hongos; también son producidos por varias plantas como la avena y algas y pueden obtenerse de bacterias y hongos (*Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*) (Boltaña et al., 2011; Kum and Sekkin, 2011)

Las primeras investigaciones que documentan este tipo de compuestos eran realizadas adicionando cultivos de levaduras “completas” en las dietas, utilizándolas como probióticos y como inmunoestimulante en los peces, incrementando con ello su resistencia a enfermedades (Tabla 2) causadas por patógenos y representando una opción para mejorar su salud (Akramienė et al., 2007; Welker *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2012).

Dentro de las principales levaduras utilizadas en investigación para la mejora del sistema inmune de los peces, podemos encontrar a *Debaryomyces hansenii* y a *Saccharomyces cerevisiae*, mismas que son fuentes importantes de β -glucanos, siendo

utilizadas en el desafío contra diversos organismos patógenos y utilizadas como promotoras de crecimiento (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008).

Los β -glucanos provenientes de distintas fuentes, a su vez tienen distinta estructura molecular; todos comparten una estructura base y están vinculados con enlaces glucosídicos β . Los números 1,4 y 6 identifican los átomos de carbono en cada extremo del enlace glucosídico; los más comunes son los β -glucanos insolubles (1,3 / 1,6) que cuentan con mayor actividad biológica que sus homólogos solubles (1,3 / 1,4). La cebada y la avena principalmente poseen β -glucanos lineares con regiones largas de vínculos β (1,4), separando tramos más cortos de estructuras β (1,3); los β -glucanos de los hongos tienen ramas cortas β (1,6) salientes, unidas a la estructura base β (1,3); los β -glucanos encontrados en la pared celular de las levaduras cuentan con ramas β (1,6) adicionalmente elaboradas con regiones β (1,3) (Hartwell, 1974; Hiss and Sauerwein, 2003; Akramienė *et al.*, 2007).

Actualmente los inmunoestimulantes son compuestos que han tenido una gran aceptación dentro de la acuicultura de los salmónidos y no salmónidos para mejorar el bienestar y salud de los peces. Gracias a la tecnología actual, existen ahora en los mercados, productos derivados de cultivos de levaduras con un alto contenido de β -glucanos purificados que permiten una respuesta del sistema inmune innato al ser administrado oralmente. Estudios recientes demuestran la actividad de los β -glucanos (1,3 / 1,6 glucanos) obtenidos de *S. cerevisiae* en pargos, demostrando estimulación de la respuesta celular del sistema inmune no específico al incrementar los niveles de leucocitos en los peces tratados (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011); en bagre de canal (*I. punctatus*) se demostró que la suplementación oral con *S. cerevisiae* incrementa la actividad fagocítica afectando a los monocitos sanguíneos (Zhu *et al.*, 2012).

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Dentro de la rama piscícola, el uso de inmunoestimulantes, representa un campo relativamente nuevo, con importantes aportaciones para la ciencia. La utilización de estos compuestos contra agentes bacterianos infecciosos se encuentra actualmente bien documentada; sin embargo, existe poca literatura asociada al efecto inmune de los prebióticos y su relación en contra de agentes parasitarios, representando una novedosa fuente para la investigación. Al mejorar la inmunidad de los peces con prebióticos se podría reducir el uso de agentes químicos (antibióticos y desparasitantes), evitando generar resistencia y logrando una producción más sana y natural, beneficiando al consumidor final.

Tamaulipas es el principal productor de bagre de canal bajo sistemas controlados a nivel nacional, y esta explotación representa una importante actividad económica en el sector privado y social, lo que generó una derrama de 57 millones de pesos en 2010. En estudios recientes se ha demostrado la elevada prevalencia parasitaria, principalmente de *Ligictaluridus floridanus*, forzando a los productores a utilizar excesivamente agentes químicos para su control. Es aquí donde se pretende beneficiar al sector productivo, llevando una nueva herramienta para el control de parásitos. Al inmunoestimular inespecíficamente a los peces cultivados adicionando β -glucanos (1,3 / 1,6) y vitamina C (ácido ascórbico) a dietas comerciales antes de ser sometidos a estrés por manejo o por el ambiente, se pretende incrementar la resistencia ante organismos infecciosos.

4. HIPÓTESIS

Capítulo 1

El uso de productos antiparasitarios como el prazicuantel, metrifonato y peróxido de hidrógeno reducirán las infecciones en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) causadas por el metazoario *Ligictaluridus floridanus*.

Capítulo 2

El uso de productos como los β -glucanos (1,3 / 1,6) y el ácido ascórbico adicionados a la dieta, causarán estimulación del sistema inmune no específico del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*).

5. OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto causado por los β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico al ser adicionados a la dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, en parámetros de respuesta inmune.

5.1. Objetivos Particulares

Capítulo 1

1. Evaluar *in vivo* e *in vitro* diversos tratamientos antiparasitarios en infecciones naturales de *Ligictaluridus floridanus* en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*).

Capítulo 2

2. Evaluar el efecto de los β -glucanos (1,3 / 1,6) en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

3. Evaluar el efecto del ácido ascórbico en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

6. CAPITULO 1. EVALUACIÓN DE AGENTES ANTIPARASITARIOS EN INFECCIONES NATURALES DE *L.* *floridanus* EN EL BAGRE DE CANAL

6.1. Resumen

En la acuicultura, los tratamientos contra parásitos de los peces incluyen el uso de agentes quimioterapéuticos para controlar y prevenir las enfermedades. El praziquantel (Pzq), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y metrifonato (Mtf) son productos comunes que se utilizan en las infestaciones por ectoparásitos en cultivos de peces. El objetivo de este capítulo fue evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de baños de Pzq, H_2O_2 y Mtf en contra del parásito monogeno, *L. floridanus*. Los experimentos *in vitro* consistieron en evaluar el tiempo de sobrevivencia parasitaria a distintas concentraciones de los agentes químicos antes mencionados sumergiendo los arcos branquiales completos, con al menos cinco parásitos cada uno. Para los baños con Pzq se utilizaron soluciones a concentraciones de 2, 5, y 10 mg/L; para el H_2O_2 se utilizaron 150, 300 y 570 mg/L y para el Mtf se calcularon los baños a razón de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/L. Los bioensayos *in vivo* utilizaron para la aplicación baños *in situ* con las concentraciones más efectivas obtenidas previamente de los experimentos *in vivo* 10, 570 y 0.05 mg/L para Pzq, H_2O_2 y Mtf respectivamente. Los resultados *in vitro* obtenidos con Pzq indican una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) al utilizar solución salina (0.065%) como diluyente en el tratamiento, frente al grupo que utilizó agua proveniente del acuario; en el experimento *in vivo* se demostró una reducción significativa ($p < 0,05$) en la prevalencia y la intensidad media parasitaria, y una reducción en la abundancia de parásitos en los peces tratados. Los experimentos con Mtf no demuestran reducción significativa ($p > 0,05$) en la intensidad media parasitaria por arco branquial ni en el tiempo de sobrevivencia *in vitro* de *L. floridanus*. Los baños con H_2O_2 a 570 mg/L durante 4 min fueron significativamente ($p < 0,05$) eficaces contra adultos y estados inmaduros de *L. floridanus*. Estos estudios sugieren que el Pzq puede ser utilizado como un agente de control en infecciones naturales de *L. floridanus*; mientras que el H_2O_2 es 100% eficaz y puede ser utilizado como un agente antiparasitario.

6.2. Introducción

Los trematodos monogeneos se encuentran comúnmente en la piel y las branquias de los animales acuáticos y anfibios; *Ligictaluridus floridanus* es el ectoparásito más prevalente (85,5%) en las granjas de Tamaulipas de bagre de canal (Rábago-Castro *et al.*, 2011), y cuyo rango de distribución natural es desde la parte central y sureste de los Estados Unidos hasta el de México, a la (Rosas-Valdez and Pérez-Ponce de León, 2005). Las infecciones subclínicas por patógenos es decir, sin signos clínicos aparentes, pueden presentarse comúnmente en los cultivos acuícolas ocasionando una reducción en la alimentación y producción, incrementando el estrés, la inmunosupresión y la susceptibilidad a las infecciones bacterianas y fúngicas. Se ha demostrado que *L. floridanus* afecta el crecimiento de bagre de canal (Rábago-Castro *et al.*, 2014), y causa inflamación en el sitio de la adhesión del parásito (Schelkle *et al.*, 2009). El hacinamiento en los cultivos de bagre en jaulas promueve la transmisión de ectoparásitos entre los peces (Villamil *et al.*, 2003); esto es especialmente beneficioso para incrementar la infestación de *L. floridanus* debido a su ciclo directo.

En la acuicultura, varios productos se han utilizado contra ectoparásitos externos, pero algunos de ellos, como las cloraminas, sulfato de cobre y la formalina tener efectos secundarios sobre los peces, como la inmunosupresión, la toxicidad branquial, y también las sobredosis son fáciles debido a su bajo índice terapéutico (Scot, 1993). El praziquantel es un compuesto de amplio espectro utilizado contra los parásitos, que es eficaz contra monogeneos por baño por inmersión (KiHong and JaeBum, 2000, Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011); se trata de una isoquinolona que causa parálisis en los trematodos y daña el tegumento. El peróxido de hidrógeno es un fuerte agente oxidante encontrado comercialmente como una solución al 3% o 30-35%. En el cultivo de peces se usa para tratar la hipoxia ambiental aguda, infecciones fúngicas y bacterianas y como parasitocida (Lumsden *et al.*, 1998). El H₂O₂ está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en acuicultura y no requiere de un tiempo de retiro establecido. El metrifonato, también conocido como triclorfón, es un organofosforado utilizado desde la década de 1950 en el ganado, caballos y otras especies menores en la agricultura, para

controlar los insectos y como un antihelmíntico (Heitzman et al., 2000; El-Gohary *et al.*, 2005). En los seres humanos, se utiliza comúnmente para tratar la esquistosomiasis, una enfermedad parasitaria causada por el trematodo *Schistosoma* spp. Esta sustancia es un inhibidor de la colinesterasa y recientemente, se ha utilizado para tratar la enfermedad de Alzheimer (López-Arrieta and Schneider, 2006).

En el presente capítulo se evalúan y analizan los efectos del praziquantel, peróxido de hidrógeno y metrifonato como agentes antiparasitarios contra *L. floridanus* en experimentos *in vitro* e *in vivo* con bagres de canal (*I. punctatus*) infectados naturalmente.

6.3. Material y métodos

6.3.1. Diseño experimental

Se llevaron a cabo dos experimentos *in vitro* y dos *in vivo* a distintos tiempos. Primero se evaluó la eficacia del praziquantel *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente se utilizó peróxido de hidrógeno y metrifonato en experimentos *in vitro* e *in vivo* como agentes antiparasitarios.

Los peces utilizados para los experimentos fueron adquiridos en una granja comercial, los cuales estaban infectados de manera natural con *L. floridanus*; la identificación del parásito se realizó mediante las claves de Hoffman (1985) y Hoffman (1999). Los peces fueron trasladados en tanques de fibra de vidrio con aireación al Laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “Dr. Norberto Treviño Zapata” en Cd. Victoria, Tamaulipas, donde se llevaron a cabo los experimentos de este capítulo.

6.3.1.1. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del praziquantel como antiparasitario

Para la evaluación *in vitro* del Pzq se utilizó el método de Hirazawa *et al.*, (2000) con ligeras modificaciones; para ello fueron preparadas nueve soluciones con Pzq (Cisticid®, Merck SA de CV, México.) a razón de 2, 5 y 10 mg/L utilizando solución salina (0.65%), agua destilada y agua de acuario como diluyentes para cada una de las concentraciones antes mencionadas; estos tratamientos fueron comparados contra el control (solución salina -0.65%-, agua destilada y agua de acuario); se utilizaron diez peces con un peso promedio de 31.87 ± 3.98 g y una longitud furcal media de 14.40 ± 0.50 cm. Los peces fueron sacrificados por punción craneal y les fueron diseccionados los arcos branquiales; se eligieron aquellos arcos branquiales con al menos cinco *L. floridanus*; posteriormente los arcos branquiales fueron sumergidos en 50 mL de cada una de las soluciones de praziquantel y controles; la temperatura de la solución a 22° C en una caja de Petri cada uno. La eficacia de las soluciones con praziquantel y de los

controles sobre *L. floridanus* se determinó por la ausencia de movimiento o la inactividad total de los parásitos (inmaduros y adultos) al ser observados bajo un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss®, Stemi 2000-C, Göttingen, Alemania).

El estudio *in vivo* se realizó de acuerdo a las especificaciones de Silveira-Coffigny (2006), con ligeras modificaciones. Para ello se utilizaron veintitrés juveniles de bagre de canal, clínicamente sanos, pero naturalmente infectados con *L. floridanus*. Los peces tuvieron un peso promedio de 27.24 ± 2.04 g y una longitud furcal media de 13.30 ± 0.86 cm y fueron colocados en un tanque de fibra de vidrio de 80 L, con aireación suministrada por un soplador y un flujo continuo de agua proveniente de un pozo profundo. Una muestra de cinco peces fue tomada para confirmar la infección del parásito. Para ello, los peces fueron anestesiados con benzocaína (40 mg/L) y posterior a ello se sacrificaron mediante punción craneal. La infección con el parásito fue confirmada diseccionando los arcos branquiales del lado izquierdo de los peces, examinándolos bajo un microscopio estereoscópico, mostrando una media de 2.5 ± 1.0 parásitos por arco branquial. Después de esto, los peces restantes se dividieron aleatoriamente en un grupo control y un grupo de tratamiento, con tres repeticiones de tres peces en cada uno, utilizando seis acuarios con una capacidad de 40 L para el experimento; los acuarios fueron llenados con 37 L de agua, y el nivel fue mantenido con un flujo constante de agua (18 L/h).

Los peces estaban clínicamente saludables y se aclimataron durante 4 días antes de iniciar el tratamiento. Al comienzo del tratamiento, el flujo de agua en los acuarios del grupo control y acuarios del grupo tratado se interrumpió durante 3 h, reduciendo el volumen de agua a 10 L; luego, se añadieron al agua en los acuarios tratados 100 mg de praziquantel diluidos en agua (100 mL) para alcanzar una concentración final de 10 mg/L.

Los peces fueron sometidos a tres baños de 3 h cada uno, y se llevaron a cabo con intervalos de 72 h para los acuarios tratados; durante este tiempo, las paredes internas de los acuarios tratadas se limpiaron con toallas de papel para eliminar los

huevos de *L. floridanus* que se hubieran adherido a las paredes internas del acuario; posteriormente las paredes se enjuagaron con la solución de praziquantel contenida en cada acuario. La misma administración, reducción de nivel del agua y la limpieza de la pared se realizaron en los acuarios control. Después de tres horas de tratamiento, los niveles de agua se devolvieron al volumen inicial (37 L).

Durante el experimento, los peces fueron alimentados dos veces al día *ad libitum* con una dieta comercial para bagre (32% de proteína) con un tamaño de partícula 3 mm. Veinticuatro horas después del último baño de tratamiento, los peces fueron anestesiados con benzocaína (40 mg/L) y sacrificados mediante punción craneal; los cuatro arcos branquiales del lado izquierdo fueron examinados para obtener la prevalencia, intensidad y abundancia de *L. floridanus* (inmaduros y adultos) bajo un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss®, Stemi 2000-C, Göttingen, Alemania) colocándolos en placas Petri con solución salina (0.65%).

6.3.1.1.1. Análisis Estadístico. Los datos de los ensayos *in vitro* se analizaron con la prueba no paramétrica de Kaplan-Meier obteniendo la proporción acumulativa de sobrevivencia, agrupados por grupo control y grupos con tratamientos de distintas dosis de Pzq; además, los datos obtenidos en cada desafío de sobrevivencia fueron analizados bajo la prueba ANOVA. Los datos donde se utilizó agua destilada y agua de acuario como diluyentes se transformaron con Sen para satisfacer los supuestos del ANOVA de normalidad (Kolmogórov-Smirnov) y homocedasticidad de varianza (Bartlett), mientras que los datos del grupo de solución salina (0.65%) no necesitaron transformación. Para el experimento *in vivo*, la prevalencia, intensidad y abundancia de *L. floridanus* se obtuvieron de acuerdo a Bush *et al.*, (1997), y Mladineo (2005) para la obtención de la media parasitaria por arco branquial; los datos se transformaron con Log10 para cumplir los supuestos de ANOVA y se evaluaron con ANOVA utilizando el software comercial Statistica® v6.1 (StatSoft®, Inc. Tulsa, OK, EE.UU.) con niveles de significancia de $\alpha=0,05$ y $\alpha=0,02$.

6.3.1.2. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del peróxido de hidrógeno y metrifonato como antiparasitarios

Para estos estudios se utilizaron cincuenta y un juveniles de bagre de canal, clínicamente sanos, pero, naturalmente infectados con *L. floridanus*, confirmando la infección y transportados de la manera antes mencionada. Los peces tuvieron un peso promedio de $26,75 \pm 1,76$ g una longitud furcal media de $13,56 \pm 1,00$ cm.

Para el experimento *in vitro* se utilizaron quince peces, siguiendo el método descrito por Hirazawa *et al.*, (2000) con ligeras modificaciones. Para ello, nueve soluciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de grado comercial (3%) se prepararon a 150, 300 y 570 mg/L usando como diluyentes solución salina (0,65%) (SS), agua destilada (DW) y agua del acuario (AW). Del mismo modo se prepararon soluciones con metrifonato (Mtf) a razón de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/L usando los mismos diluyentes como con el H_2O_2 para un total de nueve tratamientos. Los tratamientos con H_2O_2 y Mtf se compararon con la SS, DW y AW como controles. Después de los tratamientos los peces fueron sacrificados con 120 mg/L de benzocaína (Cedrosa, México) y sus arcos branquiales extirpados; se utilizó el criterio de que cada arco branquial debía tener más de cinco *L. floridanus* para el estudio; las branquias fueron seleccionados al azar y se sumergieron en 50 mL de cada solución preparada a 22° C; las branquias se observaron en una caja de Petri constantemente bajo un estereoscopio para medir el tiempo de supervivencia de los parásitos.

El experimento *in vivo* tuvo una duración de 16 d. Un total de treinta y seis peces fueron divididos en tres grupos, cada uno con tres repeticiones con cuatro peces en cada acuario. Los grupos fueron H_2O_2 , Mtf y el grupo control. Los peces se aclimataron durante cuatro días antes del inicio del experimento; los bagres de canal utilizados fueron asignados aleatoriamente en nueve acuarios con capacidad de 40 L y llenados con 37 L de agua proveniente de un pozo profundo con un flujo constante (18 L/h) y agua aireada artificialmente con un soplador. Al comienzo de cada tratamiento, el flujo de agua en los acuarios tratados se interrumpió y el volumen de agua redujo a 10 L; el

grupo de H₂O₂ recibió 570 mg/L de H₂O₂ (3%) durante 4 min; el grupo Mtf recibió 0,5 mg/L de Mtf durante 10 min. Los tratamientos se realizaron en los días 3, 7 y 11. Inmediatamente después de transcurrir el tiempo de tratamiento del acuario se llenó al nivel anterior y el flujo de agua fue restablecido. Durante todo el bioensayo, los peces fueron alimentados dos veces al día *ad libitum* con alimento comercial para bagre con un tamaño de partículas de 3 mm, que contiene 32% de proteína. Los peces fueron muestreados en los días 0, 4, 8 y 12 del experimento. Todos los peces en los acuarios fueron anestesiados *in situ* con benzocaína (40 mg/L), añadiendo el compuesto al recipiente; luego, fue tomado al azar un pez de cada acuario y fue sacrificado de la manera antes mencionada en el bioensayo *in vitro*; a continuación los cuatro arcos branquiales de la parte izquierda de cada pez se examinaron bajo el estereoscopio, colocando los tejidos en cajas de Petri con solución salina (0,65%). La infestación inicial de parásitos se determinó en el día 0. Durante el experimento la temperatura del agua, oxígeno disuelto y pH se midieron con un kit de agua dulce (La Motte®, Chertestwon, MD, EE.UU.).

6.3.1.2.1. Análisis estadístico. Los datos de los ensayos *in vitro* se analizaron con la prueba no paramétrica de Kaplan-Meier obteniendo la proporción acumulativa de sobrevivencia, agrupados por el grupo control y los grupos de tratamiento (Mtf y H₂O₂) a las distintas dosificaciones en los ensayos con diferentes diluyentes. El tiempo de supervivencia se analizó bajo la prueba de ANOVA no paramétrica Kruskal-Wallis.

Para el experimento *in vivo* se determinó la prevalencia e intensidad media de *L. floridanus* (inmaduros y adultos) obtenida de acuerdo a Bush *et al.*, (1997) y Mladineo (2005) para obtener la media parasitaria por arco branquial. Los datos fueron transformados mediante la función Coseno para cumplir con los supuestos de normalidad (Kolmogórov-Smirnov) y homocedasticidad de varianza (Bartlett), y luego evaluadas por ANOVA; diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos fueron identificados mediante una prueba de mínima diferencia significativa de Fisher.

6.4. Resultados

6.4.1. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del praziquantel como antiparasitario

Se observó un efecto significativo del Pzq sobre el tiempo de supervivencia de los parásitos durante el ensayo *in vitro* (Tabla 3, Figura 2); además, se observó que los parásitos se desprendían de las branquias, antes de que dejaran de moverse.

Tabla 3

Media \pm EE del tiempo de supervivencia de *Ligictaluridus floridanus* por arco branquial expresado en segundos inmerso *in vitro* en soluciones con praziquantel al utilizar solución salina (SS) (0.65%), agua destilada (DW) y agua de acuario (AW) como diluyentes.

Grupo	Arco branquial 1	Arco branquial 2	Arco branquial 3
Sol. Salina (SS) (0.65%)	661.88 \pm 97.84	675.55 \pm 11.07	864.29 \pm 83.57
2 mg/L Pzq (SS)	549.33 \pm 54.25	645.22 \pm 66.97	574.00 \pm 88.21
5 mg/L Pzq (SS)	502.40 \pm 132.40	448.36 \pm 78.78	353.09 \pm 59.11
10 mg/L Pzq (SS)	244.00 \pm 114.70	328.17 \pm 67.45	381.38 \pm 61.93
Agua Destilada (DW)	3000.50 \pm 481.49	3419.00 \pm 496.26	3071.17 \pm 691.88
2 mg/L Pzq (DW)	2389.00 \pm 105.78	2387.00 \pm 402.17	1880.50 \pm 134.38
5 mg/L Pzq (DW)	890.50 \pm 140.31	1273.63 \pm 239.15	692.50 \pm 67.32
10 mg/L Pzq (DW)	1370.20 \pm 362.28	923.00 \pm 493.16	1338.80 \pm 344.14
Agua de Acuario (AW)	6039.00 \pm 597.53	5390.82 \pm 524.07	5742.29 \pm 105.58
2 mg/L Pzq (AW)	3295.11 \pm 472.36	3214.86 \pm 490.36	6061.50 \pm 253.89
5 mg/L Pzq (AW)	2413.43 \pm 718.26	2099.89 \pm 482.66	2674.86 \pm 891.82
10 mg/L Pzq (AW)	1408.60 \pm 821.07	3463.43 \pm 1120.93	3466.60 \pm 492.12

Los parásitos que recibieron 10 mg/L de Pzq utilizando Solución Salina (SS) como diluyente mostraron una contracción (forma curvada) casi inmediata al tener contacto con la solución. El tiempo de supervivencia de *L. floridanus* en la SS (Tabla 3) mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos los grupos; el grupo control y el grupo tratado con 2 mg/L de Pzq SS tuvieron una diferencia mayor ($p < 0.02$) con respecto a los otros grupos (figura 2A).

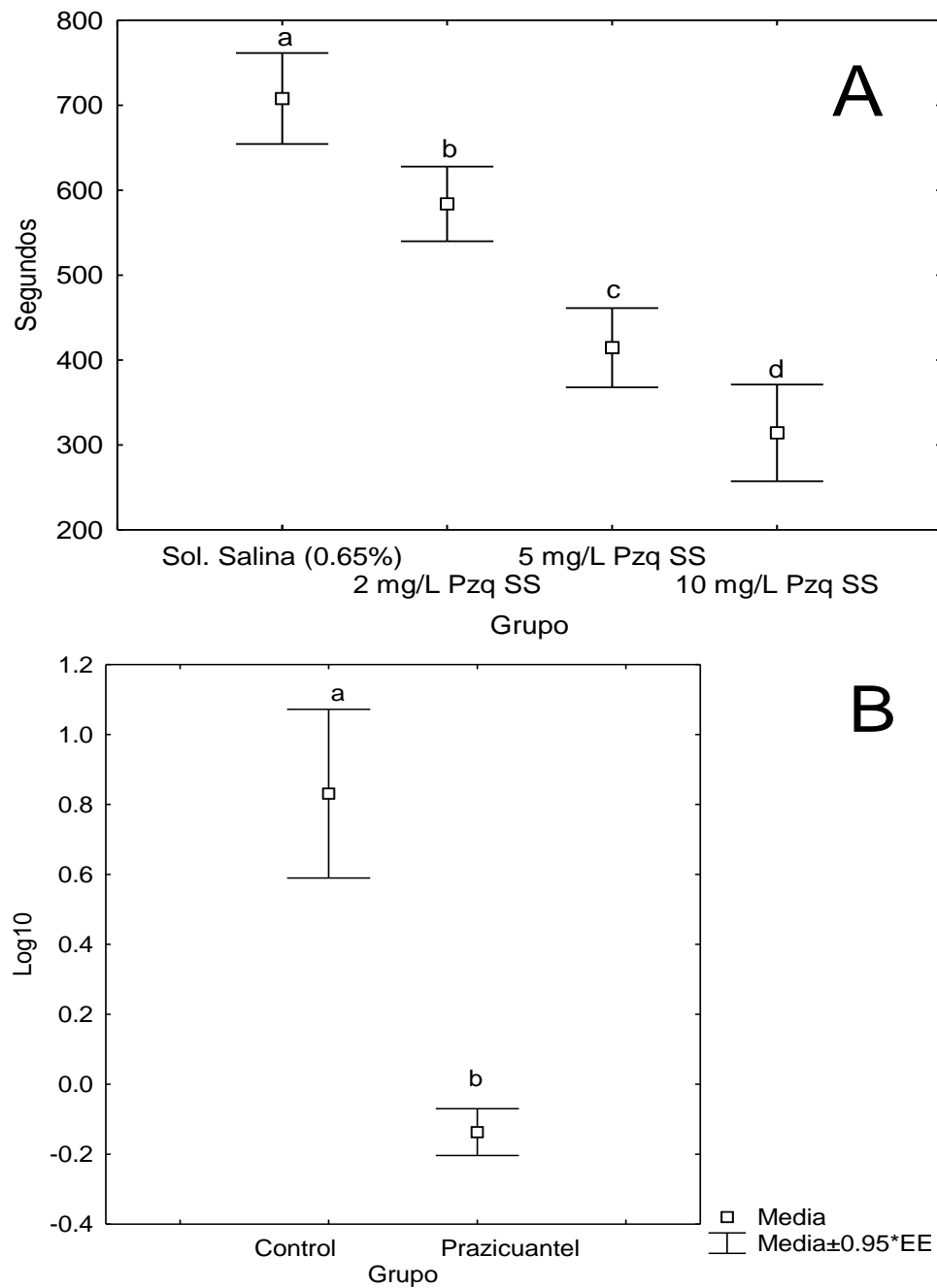


Figura 2. Diferencias significativas ($p < 0.05$) indicadas por distintas letras entre grupos al administrar 10 mg/L de praziquantel. (A) Media expresada en segundos del tiempo de sobrevivencia de *Ligictaluridus floridanus* por arco branquial utilizando SS como diluyente en el experimento *in vitro*. (B) Media del número total de *Ligictaluridus floridanus* por arco branquial en el experimento *in vivo*, contados 24 h posteriores a la administración del tratamiento (10 mg/L). Data = $\text{Log}_{10} \pm \text{EE}$. N=3 por grupo.

Los parásitos expuestos a Pzq en el grupo que utilizó agua de acuario como diluyente, mostraron un tiempo de sobrevivencia más largo que los parásitos expuestos a otras soluciones diluyentes (Figuras 3 y 4).

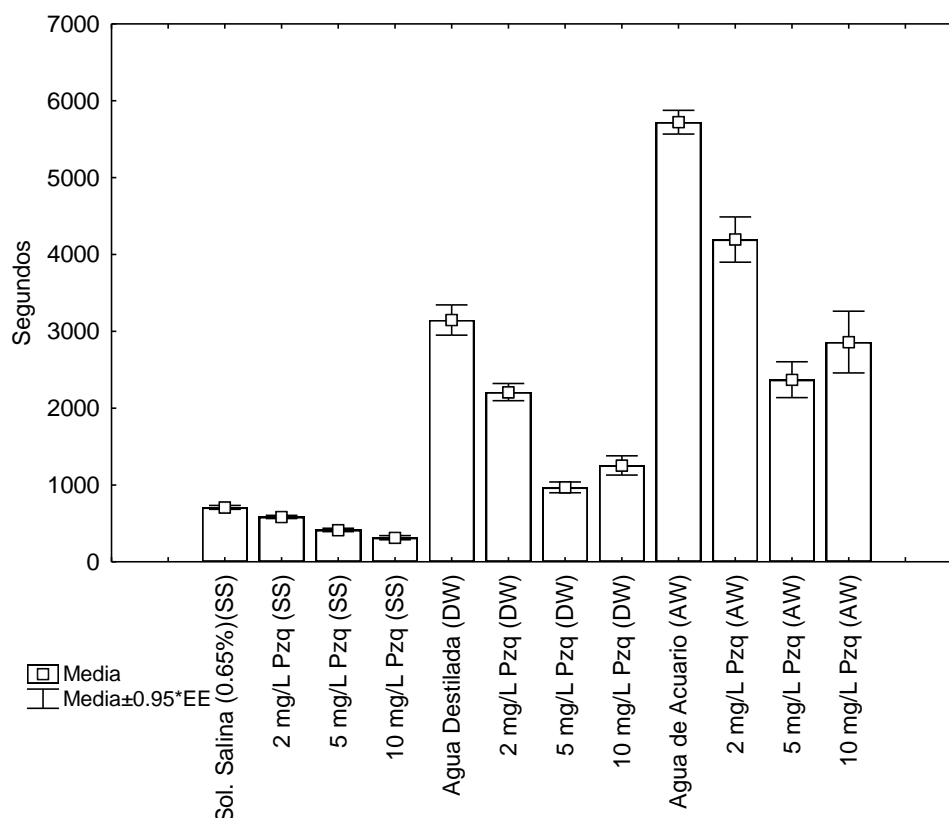


Figura 3. Gráfico comparativo del tiempo de sobrevivencia de *Ligistaluridus floridanus* en arcos branquiales expuestos a praziquantel y solución salina (0.65%) (SS), agua destilada (DW) y agua de acuario (AW) como diluyentes y controles.

Al realizar el análisis de Kaplan-Meier se observaron diferencias entre los grupos de tratamientos y controles (Figura 4); los parásitos en los arcos branquiales de los grupos control y 2 mg/L comenzaron a morir en tiempos muy distintos; mientras que en los grupos de 5 y 10 mg/L, casi el 20% de todos los parásitos observados murió en menos de 100 segundos.

La prevalencia parasitaria mostrada en el grupo control y el grupo tratado (10 mg/L Pzq) en el experimento *in vivo* fue de 100% y 66.6% respectivamente; mientras

que la intensidad parasitaria media por pez entre el grupo control y el grupo de tratamiento fue de 76.22 y 5.0 respectivamente; la abundancia parasitaria en el grupo control fue mayor que el grupo tratado, con 76.22 y 3.33, respectivamente.

La media de parásitos por arco branquial en el ensayo *in vivo* mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y los grupos tratados (Tabla 4); los datos (Log10) también mostraron diferencias significativas ($p < 0.02$) entre el grupo control y los grupos tratados (Figura 2B) con 10 mg/L de praziquantel.

Tabla 4

Media \pm EE del número total de *Ligictaluridus floridanus* por arco branquial, contados 24 h posteriores al tercer baño del experimento *in vivo* en los grupos control y de tratamiento.

Acuario	Grupo	# Pez			Media/Acuario*
		1	2	3	
A	Tratado	0	0	0	0 ^a
B	Control	3 \pm 0.47	4.5 \pm 1.10	0.75 \pm 0.55	2.75 \pm 1.09 ^b
C	Tratado	1 \pm 0.47	0.5 \pm 0.33	0.5 \pm 0.33	0.67 \pm 0.17 ^a
D	Control	6.25 \pm 2.07	33.25 \pm 11.37	21.25 \pm 4.69	20.25 \pm 7.79 ^b
E	Control	4.25 \pm 1.52	8.5 \pm 2.13	4 \pm 1.33	5.58 \pm 1.46 ^b
F	Tratado	0.25 \pm 0.29	0.25 \pm 0.29	1.25 \pm 1.09	0.58 \pm 0.33 ^a

*Diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) están señaladas por distintas letras.

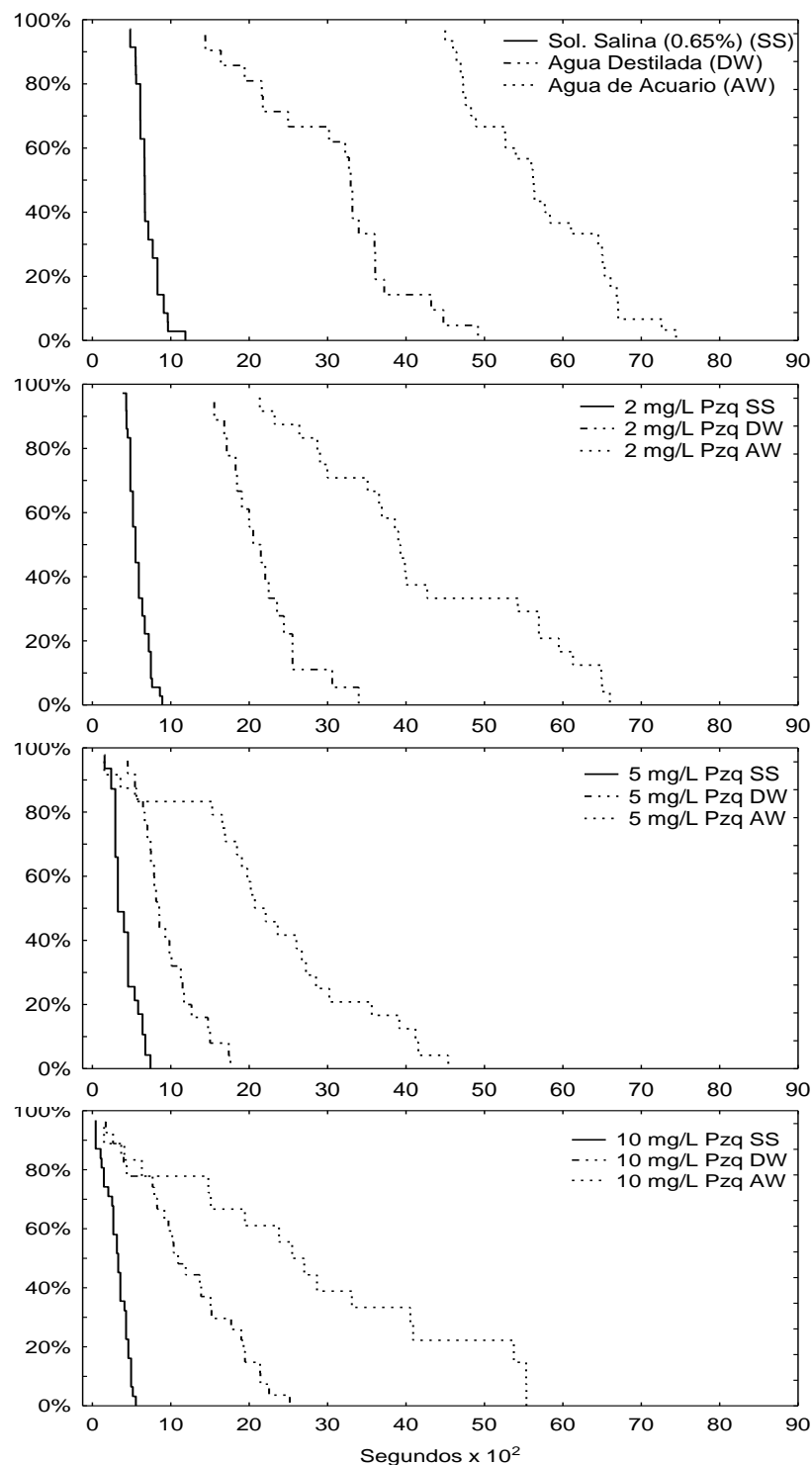


Figura 4. Comparación del tiempo de sobrevivencia parasitaria (*Ligictalurus floridanus*) por arco branquial en segundos usando la prueba de Kaplan-Meier de proporción de sobrevivencia acumulada en el ensayo *in vitro* expuestos a praziquantel a razón de 2,5 y 10 mg/L.

6.4.2. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del peróxido de hidrógeno y metrifonato como antiparasitarios

La temperatura del agua se mantuvo en 26.5 ± 1.5 °C; el pH del agua de los acuarios fue de 7.5 y el oxígeno disuelto en promedio fue de 5.9 ± 0.6 mg/L. No se observó mortalidad de los peces.

Los resultados *in vitro* mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos los grupos de H_2O_2 a 570 mg/L en comparación con los otros grupos (Tabla 5). Del mismo modo, los grupos con 300 mg/L de H_2O_2 mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los grupos, excepto para el grupo que utilizó DW como diluyente. Los grupos que utilizaron metrifonato con agua destilada y agua de acuario como diluyentes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre ellos, a excepción del grupo que utilizó metrifonato a razón de 0.75 mg/L con agua destilada como diluyente (Tabla 5).

La prevalencia de *L. floridanus* en el grupo control y el grupo de metrifonato durante el experimento *in vivo* fue de 100% en cada uno de los días de muestra; es decir, tuvieron parásitos presentes en cada uno de los días de muestra; en los peces tratados con peróxido de hidrógeno la prevalencia parasitaria disminuyó de un 100% en el día 0 del experimento a 0% en los días de muestreo 4, 8 y 12 (Figura 5).

La intensidad media parasitaria de *L. floridanus* en el grupo control fue de 170.67, 256.00, 398 y 176.67 para los días 0, 4, 8 y 12 respectivamente. Los peces tratados con metrifonato mostraron una intensidad media parasitaria más baja que el grupo de control con 161.33 y 125.33 en los días 4 y 8, mientras que fue más alta en los días 0 y 12 mostrando 181.33 y 336.67 respectivamente.

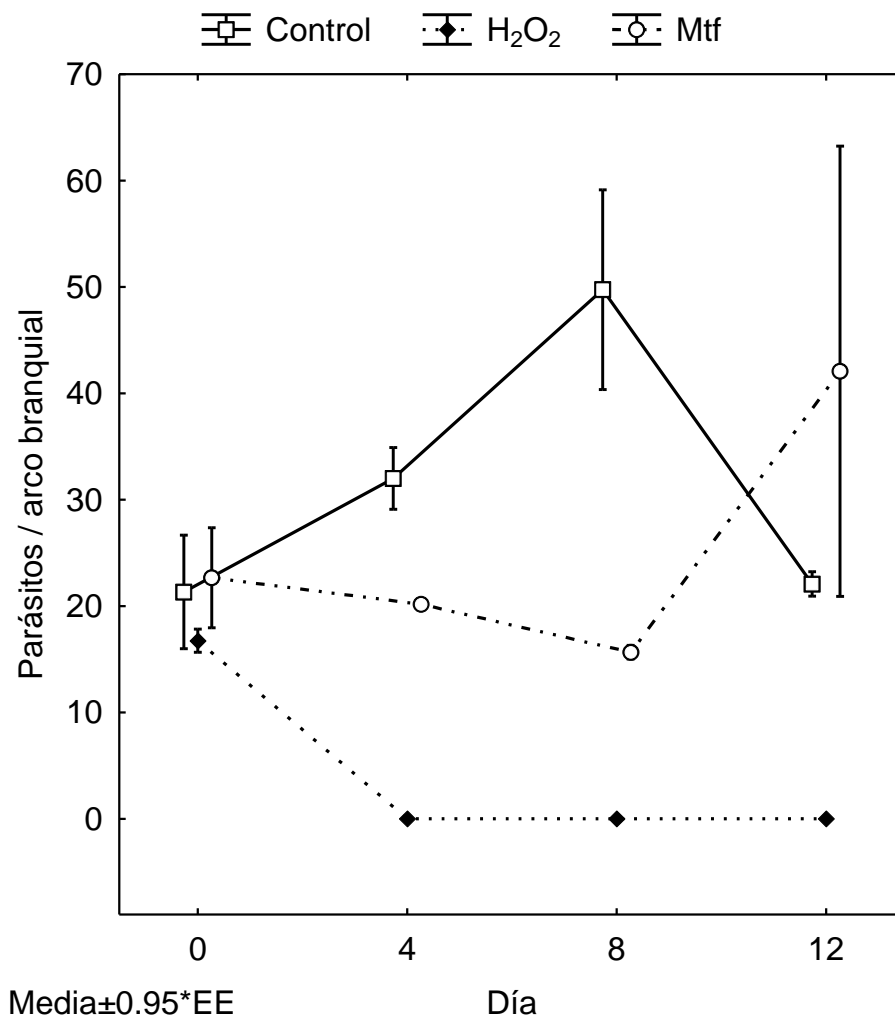


Figura 5. Cantidad de parásitos (*Ligictaluridus floridanus*) por arco branquial (Media \pm EE) en los días de muestra del bioensayo *in vivo*.

Los juveniles tratados con peróxido de hidrógeno tuvieron una intensidad media inicial de *L. floridanus* de 67,00 parásitos en el día 0; después del tratamiento inicial en los días 4, 8 y 12 no se hallaron parásitos. Una vez que se llevó a cabo el primer baño de tratamiento la infestación media de parásitos de *L. floridanus* por arco branquial (Figura 5) mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo tratado con peróxido de hidrógeno y los otros dos grupos experimentales.

Tabla 5

Media \pm EE del tiempo de sobrevivencia de *Ligictaluridus floridanus* por arco branquial expresado en segundos inmerso *in vitro* en soluciones con metrifonato (Mtf) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al utilizar solución salina (SS) (0.65%), agua destilada (DW) y agua de acuario (AW) como diluyentes.

Grupo	Arco branquial 1	Arco branquial 2	Arco branquial 3
Sol. Salina (0.65%) (SS)	1861.75 \pm 1258.56	1995.21 \pm 1094.77	2164.29 \pm 1099.17
0.25 mg/L Mtf (SS)	2308.24 \pm 864.92	2875.27 \pm 1064.90	2927.68 \pm 1326.15
0.50 mg/L Mtf (SS)	3798.65 \pm 2164.97	3996.79 \pm 1005.69	3418.82 \pm 1019.84
0.75 mg/L Mtf (SS)	3426.11 \pm 1166.16	2452.26 \pm 373.08	2750.22 \pm 692.78
150 mg/L H ₂ O ₂ (SS)	1360.65 \pm 537.79	763.40 \pm 429.86	697.50 \pm 209.87
300 mg/L H ₂ O ₂ (SS)	203.69 \pm 148.78	207.00 \pm 0.00	239.00 \pm 0.00
570 mg/L H ₂ O ₂ (SS)	128.67 \pm 24.63	133.00 \pm 30.39	197.82 \pm 23.64
Agua Destilada (DW)	5573.82 \pm 1800.83	4870.00 \pm 1394.34	8886.88 \pm 4088.52
0.25 mg/L Mtf (DW)	6315.61 \pm 3862.51	6560.35 \pm 3999.35	5593.27 \pm 4014.29
0.50 mg/L Mtf (DW)	9196.33 \pm 1181.71	8987.55 \pm 1237.62	3435.77 \pm 1556.01
0.75 mg/L Mtf (DW)	3399.60 \pm 1322.96	2872.00 \pm 1286.66	2021.11 \pm 756.92
150 mg/L H ₂ O ₂ (DW)	653.69 \pm 418.03	815.35 \pm 295.77	706.90 \pm 364.90
300 mg/L H ₂ O ₂ (DW)	720.20 \pm 281.99	491.30 \pm 140.23	715.23 \pm 213.99
570 mg/L H ₂ O ₂ (DW)	243.76 \pm 87.10	902.69 \pm 145.24	151.14 \pm 134.74
Agua de Acuario (AW)	6217.60 \pm 1683.77	7207.38 \pm 1842.21	5886.00 \pm 1303.12
0.25 mg/L Mtf (AW)	9614.60 \pm 2828.86	9792.27 \pm 1995.35	9286.39 \pm 2114.16
0.50 mg/L Mtf (AW)	8624.35 \pm 3820.95	6153.33 \pm 3323.96	8755.07 \pm 4048.05
0.75 mg/L Mtf (AW)	5137.00 \pm 2022.88	5471.21 \pm 2005.91	5441.57 \pm 2195.02
150 mg/L H ₂ O ₂ (AW)	1642.00 \pm 0.00	1743.40 \pm 578.25	1000.00 \pm 0.00
300 mg/L H ₂ O ₂ (AW)	318.79 \pm 123.68	230.79 \pm 24.43	134.27 \pm 53.27
570 mg/L H ₂ O ₂ (AW)	255.08 \pm 185.08	230.48 \pm 116.17	337.77 \pm 141.38

El análisis de Kaplan-Meier para el bioensayo *in vitro* mostró diferencias entre el grupo control y los grupos tratados (Mtf y H₂O₂). Los parásitos sumergidos en soluciones de H₂O₂ mostraron significativamente menos tiempo de supervivencia (Figura 6) independientemente del diluyente utilizado en los tratamientos. El grupo que utilizó solución salina como diluyente mostró que la tasa de mortalidad de *L. floridanus* fue 50% menos de que con agua destilada o acuario (Figura 6).

Los resultados de este estudio indican claramente que la administración de peróxido de hidrógeno mediante baño de inmersión a dosis de 570 mg/L durante cuatro minutos fue 100% eficaz contra adultos y estados inmaduros de *L. floridanus*; mientras que los baños con metrifonato a 0.5 mg/L durante 10 minutos no mostraron una reducción significativa en el número de parásitos medio por arco branquial en ninguno de los tiempos de muestreo.

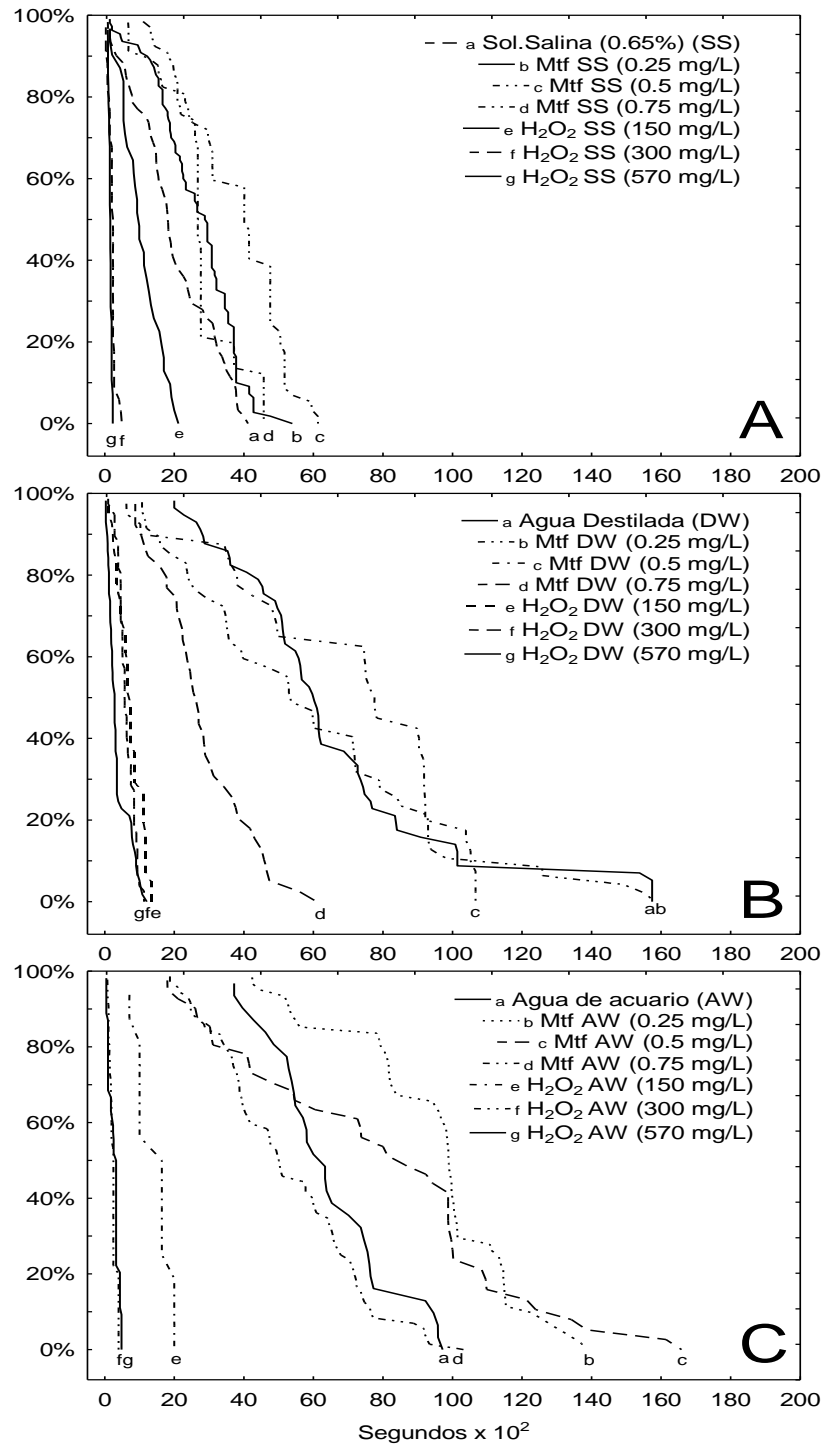


Figura 6. Gráficos comparativos del tiempo de sobrevivencia de *Ligistaluridus floridanus* en arco branquial utilizando el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier de proporción de sobrevivencia acumulada. (A) Tratamientos que utilizaron Solución Salina (0.65%) (SS) como diluyente; (B) tratamientos con agua destilada (DW) como diluyente; (C) tratamientos diluidos en agua de acuario (AW).

6.5. Discusión

6.5.1. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del praziquantel como antiparasitario

Resulta sumamente complicado lograr una desparasitación 100% efectiva en el cultivo de peces en jaula debido a que se encuentran en un ambiente muy diverso, por lo general en cuerpos de agua grandes donde resulta prácticamente imposible controlar las poblaciones parasitarias. El praziquantel parece ser un fármaco antihelmíntico eficaz (Martin *et al.*, 1997) adecuado para ser utilizado como un agente de control. En el presente capítulo, se investigaron los efectos praziquantel contra el monogeneo *L. floridanus*. El tratamiento *in vitro* donde se utilizó praziquantel a una dosis de 10 mg/L con solución salina como diluyente mostró ser el más eficaz; sin embargo, el experimento *in vivo*, no tuvo resultados similares a los hallados en el experimento *in vitro* con solución salina. El comportamiento observado en los tiempos de muerte de los parásitos por arco branquial en las poblaciones totales de los grupos control y de los grupos tratados con Pzq demuestra que encaja en una distribución normal, puesto que casi el 40% del total de parásitos contados murió en un corto período de tiempo cercano del tiempo promedio de sobrevivencia. La contracción que el parásito mostró al utilizar solución salina como diluyente no se observó durante los tratamientos de agua destilada y agua de acuario; al respecto, Hirazawa *et al.*, (2000) informaron sobre la contracción de helmintos en ensayos *in vitro* con 20 mg/L de praziquantel, y aceites de pimienta y canela utilizando agua de mar filtrada como diluyente; ello posiblemente afectó la osmorregulación del parásito debido a la alta concentración salina, además de que pudiera haber una sinergia en el ingrediente activo utilizado.

Los experimentos reportados en el presente estudio, mostraron claramente que la solución salina (0,65%) afecta el tiempo de supervivencia de *L. floridanus* (Figuras 3 y 4), probablemente debido a la presencia de sodio en la solución salina según lo reportado por Schelkle *et al.*, (2011) quienes también informaron de tratamientos antiparasitarios con cloruro de sodio en guppies (*Poecilia reticulata*), que afectan monogeneos, atribuyendo su acción a posibles cambios o interrupción de la osmorregulación; este

mismo resultado se observó en el experimento en donde se utilizó praziquantel a 10 mg/L diluido en solución salina.

Durante los 13 días que duró el estudio *in vivo*, y que abarcó desde la llegada de los peces hasta su sacrificio, se observó un aumento en el número inicial de parásitos por arco branquial en los acuarios del grupo control, en particular en el acuario D, donde uno de los peces tuvo el más alto promedio en el número de parásitos; dicho aumento pudo haber sido debido al estrés de la manipulación, lo cual puede causar inmunosupresión (Barton and Iwama, 1991) o debido al ambiente semi-cerrado que se mantiene en los acuarios, que promueve la transmisión del parásito. En otras especies de parásitos, se ha observado un incremento en el número de parásitos a temperaturas similares a las halladas en este estudio (Buchmann, 1988b).

Con la excepción de acuario A, el estudio *in vivo* mostró una reducción significativa ($p < 0.05$), pero no la eliminación de los parásitos branquiales, que podrían ser debido a la acción limitada de praziquantel en el parásito o al corto tiempo de exposición al tratamiento (Mitchell, 1995). En este sentido, Sharp *et al.*, (2004) indicaron que la especie de parásito es un factor importante en la eficacia de esta sustancia química contra los patógenos, y algunos resultados comparables han sido reportados donde el praziquantel puede reducir, pero no causar una eliminación completa de los parásitos (KiHong and JaeBum, 2000, Stephens *et al.*, 2003). Además, posiblemente las fases inmaduras del parásito se adhieren más profundamente en las branquias, y no logran ser fácilmente accesibles en el tratamiento. A este respecto, Chisholm and Whittington (2002), mencionan que la fase adulta de un monogeneo en rayas tratadas con baños de praziquantel, fue más afectada por el tratamiento, ya que esta fase se une a sitios más expuestos, en contraste a la de post-oncomiracidios y juveniles que por lo general se encuentran adheridos a las lamelas secundarias de las branquias. Este comportamiento en monogeneos de moverse a través de las branquias también es reportado por Ogawa and Inouye (1997), quienes encontraron que las fases inmaduras de *Heterobothrium okamotoi*, se fijan a parte basal de los filamentos branquiales y gradualmente se mueven en sentido distal. Por último, se sugiere que en

este estudio el praziquantel eliminó solo a los adultos y larvas, pero no a los huevos, incluso algunos huevos pudieron permanecer viables durante los tratamientos en las paredes del acuario a pesar del período de tres horas de deshidratación, y luego cuando el flujo de agua reinició y la concentración del fármaco disminuyó, ocurrió la eclosión de los oncomiracidios, y su posterior infección en las branquias de los peces.

En nuestro estudio *in vivo*, se observó variabilidad entre la prevalencia parasitaria de los acuarios tratados, siendo el acuario A el que mostró una prevalencia cero. Con respecto a lo anterior, se han encontrado resultados similares en los ensayos realizados con monogeneos externos en el cultivo de anguilas realizado en sistemas cerrados, (Buchmann *et al.*, 2011); sin embargo, otros factores tales como filtros mecánicos y fauna son elementos que también pueden influir en la prevalencia de los parásitos (Buchmann, 1988a).

Una ventaja de incluir praziquantel como agente de control para parásitos internos en bagre de canal es que tiene buena absorción a través de epitelios, evidenciado por la reducción de las metacercarias después de los tratamientos en baños (Plumb and Rogers, 1990); sin embargo se requiere el establecimiento de la correcta dosis letal para minimizar el posible desarrollo de la resistencia a praziquantel, causada por la exposición prolongada del parásito a dosis subletales.

Es necesario realizar investigación futura de tratamientos con praziquantel en diferentes etapas *L. floridanus*, debido al hecho de que ciertos tipos de estados inmaduros de monogeneos muestran resistencia al praziquantel, como *Pseudodactylogyrus bini* (Buchmann, 1988b). En conclusión, el praziquantel mostró una acción antihelmíntica, capaz de matar a *L. floridanus* presentes en las branquias del bagre de canal, y cuando es mezclado con solución salina (0,65%) puede aumentar su potencial de acción, mientras que el agua destilada o agua del acuario pueden disminuirlo.

6.5.2. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del peróxido de hidrógeno y metrifonato como antiparasitarios

El continuo desarrollo de la acuicultura en los cuerpos de agua naturales expone a los cultivos a parásitos de peces nativos, además del estrés constante al que los peces están expuestos, a técnicas incorrectas de manejo de peces en los criaderos o cultivos que pueden dar lugar a la aparición de una infestación por parásitos monogeneos; sin duda alguna, la prevención de estas situaciones es la mejor manera de evitar las infecciones (Schmahl, 1991). Por otro lado, la interacción entre los peces de granja y silvestres favorece la transmisión de diversos patógenos; al respecto Guo and Woo (2009) reportaron brotes de monogeneos (*Gyrodactylus salaris*), debido la coexistencia de los peces de cultivo con peces silvestres en estanques naturales o lagos; asimismo *Gyrodactylus salaris* es un parásito oportunista que se aprovecha de los peces de inmunocomprometidos en las explotaciones acuícolas (Scholz, 1999), de la misma manera en que *Ligistalurus floridanus* puede comportarse en las granjas de bagre en el noreste de México (Rábago-Castro *et al.*, 2011).

Las infecciones por monogeneos pueden causar graves daños en el tejido local debido a los ganchos del opisthaptor que utilizan para aferrarse a las branquias; estas lesiones pueden ser el camino para la entrada de bacterias al cuerpo, lo que complica el tratamiento de los peces y causa más estrés para el huésped, ocasionando mortalidad en los cultivos, como se ha visto con *Flavobacterium psychrophilum* en infecciones con *Gyrodactylus derjavini* (Busch *et al.*, 2003).

Los resultados de este estudio indican claramente que la administración de peróxido de hidrógeno como baño a 570 mg/L durante 4 min fue 100% eficaz contra adultos y estados inmaduros de *L. floridanus*; mientras que metrifonato en 0,5 mg/L durante 10 minutos mostró una reducción no significativa en la media parasitaria por arco branquial en los dos siguientes baños; sin embargo, en el tercer baño, se observó un incremento en el número de parásitos. Algunos estudios de metrifonato o triclorfón en monogeneos en diferentes dosificaciones que van de 0.25 hasta 200 mg/L no mostraron

efectividad en *Gyrodactylus* sp. (Schelkle *et al.*, 2009); en este sentido, Schmahl and Taraschewski (1987) y Tojo and Santamarina (1998) reportaron una reducción parasitaria no significativa en *Gasterosteus aculeatus* y *Oncorhynchus mykiss* tratados con metrifonato contra los monogeneos *Gyrodactylus aculeati* y *Diplozoon paradoxum*; por el contrario, Buchmann (1993) documentó un efecto parasiticida moderado de metrifonato contra *Dactylogyrus* spp. sobre la anguila europea (*Anguilla anguilla*), aunque también reportó toxicidad en esta especie después de 24 h de exposición y su muerte en dosis de hasta 10 mg/L; en este estudio, la infección de *L. floridanus* muestra una ligera reducción de parásitos, pero sin significancia estadística ($p > 0.05$); quizá sea necesario utilizar una mayor cantidad de metrifonato, sin embargo, hay que considerar que como todo organofosforado, podría poner en peligro la salud de los peces o causar toxicidad.

La ventaja de peróxido de hidrógeno sobre el metrifonato es principalmente de que su uso está aprobado por parte de la Food and Drug Administration (FDA) (USFDA, 2015) como un tratamiento no perjudicial para el ambiente; una vez que se oxida, se convierte en agua y oxígeno; sin embargo, la FDA no propone el uso de peróxido de hidrógeno para las infecciones por monogeneos, sino como un tratamiento bacteriano para branquias y efecto fúngico en ovas.

De acuerdo con Thomassen (2006) este producto químico se utiliza para la eliminación de parásitos de la piel y branquias y se ha empleado en varias especies de peces para la erradicación de monogeneos en diferentes tiempos y dosis. Por ejemplo, infecciones por *Gyrodactylus* spp. han sido tratadas con peróxido de hidrógeno en la trucha arco iris (*O. mykiss*) donde dosis de hasta 560 mg/L se necesitaron para eliminar los parásitos de la piel y las branquias (Rach *et al.*, 2000, Bowker *et al.*, 2012). Sitjà-Bobadilla *et al.*, (2006) también utilizaron el peróxido de hidrógeno en *Sparus aurata* L. infectados *in vivo* con *Sparicotyle chrysophrii*; no obstante, estos autores sugieren el uso de 100 mg/L durante 30 min para una reducción significativa en la abundancia de los parásitos; Cruz-Lacierda *et al.*, (2012) asimismo utilizaron este químico a una dosis de 200 mg/L durante 1 h contra infecciones de *Pseudorhabdosynochus lantauensis* en

Epinephelus coioides, sin reportar mortalidad de los peces infectados. De acuerdo con los tratamientos, la infección con *L. floridanus* en el bagre de canal se comporta de la misma manera, eliminando todos los adultos y parásitos inmaduros, aparentemente incluyendo huevos; se requiere sin embargo de investigaciones adicionales futuras, incluyendo la evaluación *in vitro* para corroborar lo anterior. Por otra parte, Mansell *et al.*, (2005) reportaron efectos negativos sobre la salud de los peces utilizando peróxido de hidrógeno en el jurel (*Seriola lalandi*) infectado por cohabitación con monogeneos de *Zeuxapta seriolae*.

En conclusión, el peróxido de hidrógeno puede erradicar efectivamente gusanos inmaduros y adultos de *L. floridanus* en branquias de bagre de canal (*I. punctatus*), pero el metrifonato no funciona tan bien como el peróxido de hidrógeno; la dosis de 570 mg/L de peróxido de hidrógeno mostró ser segura para su uso en bagre durante al menos durante cuatro minutos y eliminó a todos las fases de *L. floridanus*. El corto tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno es la principal preocupación para evitar daños branquiales. Se necesitan más estudios para evaluar el daño particular que causa en *L. floridanus*; del mismo modo, evaluar baños prolongados para establecer el daño tisular en el bagre de canal, antes de su uso en las condiciones prácticas de cultivos acuícolas.

7. CAPITULO 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS B- GLUCANOS (1,3 / 1,6) Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA INMUNOESTIMULACIÓN DE JUVENILES DE BAGRE DE CANAL AL SER ADICIONADOS A UNA DIETA COMERCIAL DEL BAGRE DE CANAL, *Ictalurus punctatus*.

7.1. Resumen

Los compuestos con capacidad de modificar la respuesta biológica de los organismos tal como probióticos y prebióticos han desarrollado un amplio campo de estudio en la acuicultura en la última década demostrando su capacidad como agentes inmunoestimulantes cobrando mucha importancia por la relación existente entre los altos niveles de estimulación principalmente del sistema inmune no específico y la alta resistencia a enfermedades bacterianas, micóticas o parasitarias; así como el incremento a la tolerancia a situaciones estresantes inmunosupresoras. Los β -glucanos (1,3 / 1,6) y el ácido ascórbico (vitamina C) son compuestos que tienen muchas de las capacidades antes mencionadas bien documentadas a diversas concentraciones, demostrando la nobleza de su uso en la industria piscícola. En este capítulo se evalúa el uso de tres concentraciones de β -glucanos (1,3 / 1,6) (0.05, 0.1 y 0.5 %) así como tres de ácido ascórbico (250, 500 y 750 mg/kg) en la función inmunoestimulante no específica en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*). Los resultados obtenidos muestran que las dietas que mayor inmunoestimulación brindaron a los peces fueron la que utilizaron β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico a una concentración de 0.05% y de 750 mg/kg respectivamente al finalizar la cuarta semana de administración de estos agentes; además, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en parámetros de actividad fagocítica sanguínea y en órganos como riñón anterior y bazo evaluando su reactividad al nitroazul de tetrazolio (NBT). Se concluye que el uso de 0.05 % de β -glucanos (1,3 / 1,6) y 750 mg/kg adicionados a la dieta del bagre de canal (*I. punctatus*) mejora el sistema inmune no específico del pez, pudiendo brindar diferentes beneficios en su cultivo comercial al incrementar la resistencia al estrés o a diversas infecciones.

7.2. Introducción

El cultivo de bagre de canal (*I. punctatus*) representa una industria ampliamente distribuida a nivel mundial que se ha desarrollado bajo diferentes métodos de cultivo; el cultivo en jaulas flotantes es un esquema intensivo altamente eficiente pero que puede desarrollar un ambiente potencialmente estresante para los peces; lo anterior, principalmente como resultado de los altos niveles de hacinamiento dentro de las jaulas; estas condiciones de estrés provocan alteraciones en el sistema inmune de los peces, volviéndolos más susceptibles a distintas enfermedades (Villamil *et al.*, 2003).

En años recientes, los inmunoestimulantes se han aplicado cada vez más en la industria acuícola, trayendo consigo distintos beneficios en los cultivos, mejorando el sistema inmune de los peces, logrando así, incrementar su resistencia al estrés (Zhao *et al.*, 2012), elevando la respuesta inflamatoria (Boltaña *et al.*, 2011), e inclusive, volviendo a los peces más resistentes a bacterias (Bonaldo *et al.*, 2009) y a infecciones parasitarias (Mohammad *et al.*, 2011).

Los glucanos se pueden encontrar en hongos, algas, levaduras, cereales y paredes celulares bacterianas (Ringø *et al.*, 2011); son polisacáridos (moléculas compuestas de glucosa) con diferente estructura molecular primaria, que varía dependiendo de la fuente donde se obtengan; teniendo también, a costa de esta variación, diferentes propiedades en cuanto a su actividad inmunoestimulante (Akramienė *et al.*, 2007). Los glucanos llamados β -glucanos poseen sus enlaces glicosídicos en posiciones moleculares β -1,3/ β -1,6; según la literatura, este tipo de β -glucanos son los que poseen una mayor habilidad para mejorar el sistema inmune (Ringø *et al.*, 2011).

Por otro lado, el ácido ascórbico está implicado en diferentes procesos en el organismo de los peces, como la síntesis de colágeno, formación de glóbulos rojos y el buen funcionamiento del sistema inmune (Ibiyo *et al.*, 2007; Corredor and Landines, 2009). El bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, es incapaz de sintetizar por si mismo el ácido ascórbico, por lo que debe obtenerlo de su ingesta alimenticia; de lo contrario, su

deficiencia ocasiona malformaciones en hueso y cartílago, así como un inapropiado funcionamiento del sistema inmune (Sealey and Gatlin, 2002; Metwally and Fouad, 2009).

En este capítulo se evaluó el efecto inmunoestimulante de los β -glucanos (1,3 / 1,6) y el ácido ascórbico al ser adicionados a una dieta comercial de bagre de canal en diferentes parámetros, enfocándose en el tiempo requerido para proveer un incremento en la respuesta inmune de los juveniles de *Ictalurus punctatus*.

7.3. Material y métodos

7.3.1. Diseño experimental

Los dos objetivos particulares comprendidos en este capítulo se llevaron a cabo en un solo bioensayo donde se evaluaron diferentes dosis de β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico comparadas contra un grupo control.

Los peces utilizados para los experimentos fueron adquiridos y transportados de la manera señalada en el punto 6.3.1 de capítulo uno. Para eliminar a *L. floridanus* al llegar a la Sala de Bioensayos, fueron bañados con 570 mg/L de peróxido de hidrógeno comercial al 3% durante cuatro min según los resultados obtenidos en el capítulo anterior, y se mantuvieron por dos semanas en aclimatación.

Este bioensayo tuvo una duración de cinco semanas y consistió en determinar la dosis de β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico que mayor inmunoestimulación proveyó a los juveniles de bagre de canal (*I. punctatus*) en condiciones de laboratorio. El oxígeno disuelto y la temperatura fueron monitoreados continuamente con un oxímetro YSI 85*(YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio) y se midió el amonio total, alcalinidad, dureza, pH, nitritos y nitratos, una vez por semana de un acuario de cada lote con un equipo LaMotte* (LaMotte Company, Maryland, EE. UU) para asegurar que los peces tuvieran buenas condiciones de desarrollo.

Se utilizaron ciento cinco juveniles de bagre de canal (*I. punctatus*) con un peso promedio de 35.04 ± 6.95 g y una longitud furcal promedio de 14.62 ± 1.25 cm, los cuales fueron distribuidos proporcional y aleatoriamente en 21 acuarios de 40 L de capacidad llenados con 37 L con abastecimiento de agua continuo (18 L/h) y aireación artificial con piedras de 5 cm.

7.3.2. Tratamientos/alimentación

Durante el periodo de aclimatación los peces fueron alimentados de manera manual con alimento para bagre con 32% de proteína cruda (Purina*), 2 veces al día durante 5 semanas, 6 días a la semana.

7.3.2.1. Preparación de dietas

Cada uno de los grupos fue alimentado durante las cinco semanas del bioensayo con una de las siete diferentes dietas experimentales. La dieta para el grupo control (DC) fue sometida al mismo proceso que las dietas experimentales el cual se detalla más adelante; sin embargo a esta dieta no le fue adicionado ningún complemento (β -glucanos o ácido ascórbico), únicamente fue la misma dieta comercial utilizada en la aclimatación con el mismo proceso para igualar condiciones.

Para llevar a cabo la adición en la DC de B-glucanos (β -1,3 / 1,6) o ácido ascórbico se hizo pasar el alimento comercial a través de un molino de piedra manual hasta obtener partículas de 250 μ m, después de eso, las partículas fueron mezcladas cuidadosamente con los β -glucanos o el ácido ascórbico previamente pesados o ninguno según fuera el caso de la dieta a preparar; para garantizar la concentración deseada se empleó una homogenizadora de polvos durante 15 min. Finalmente, se añadieron 700 mL/kg de agua a 70° C y se mezcló manualmente hasta obtener una pasta de consistencia pegajosa; después esta pasta fue comprimida pasando por un molino manual de carnicero con orificios de 3 mm para peletizar el alimento que fue secado en un cuarto a 22° C durante 48 h y almacenado a -20° C hasta su utilización.

Las dietas utilizadas para los grupos con el uso de β -glucanos (Beta-G*, extracto altamente purificado de β -1,3 / 1,6 glucanos obtenido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; Nutribem SA de CV. Guadalajara, Jalisco, México), fueron tres (tres repeticiones de cinco bagres cada uno). Las dosis a utilizar de β -glucanos (1,3 / 1,6) están basadas en Del Rio-Zaragoza *et al.*, (2011). El primer grupo (BG 0.5 1, 2 y 3)

se alimentó con 0.5% de β -glucanos (1,3 / 1,6) en la DC; el segundo grupo (BG 0.1 1, 2 y 3) se alimentó con 0.1% de β -glucanos (1,3 / 1,6) en la DC y el tercer grupo (BG 0.05 1, 2 y 3) se alimentó con 0.05% de β -glucanos (1,3 / 1,6) en la DC.

Las dietas utilizadas para los grupos con el uso de uso de ácido ascórbico (AA) fueron también tres, para formar tres grupos con tres repeticiones de cinco bagres cada uno, mantenidas bajo las mismas condiciones antes descritas. Las dosis que se utilizaron de AA están basadas en Kumari and Sahoo (2005). El primer grupo (AA 750 1, 2 y 3) utilizó 750 mg/kg de AA en la DC; el segundo grupo (AA 500 1, 2 y 3) se alimentó con 500 mg/kg de AA en la DC y el tercer grupo (AA 250 1, 2 y 3) se alimentó con 250 mg/kg de AA en la DC.

7.3.3. Muestreo

Se sacrificó un pez tomado aleatoriamente de cada uno de los acuarios, después de terminar cada una de las cinco semanas de tratamiento, los peces no fueron alimentados durante 24 h previas al muestreo. Los peces fueron manejados cuidadosamente para minimizar el estrés y fueron anestesiados en los acuarios. Cada pez anestesiado fue pesado y medido. Después se colectó muestra de sangre intracardiaca (0.5 - 1 mL) e inmediatamente después se colocó una gota sobre un portaobjetos para la prueba de glucosa y el resto de la sangre se vació cuidadosamente en un microtubo con 0.01 mL de EDTA al 1% para llevar a cabo el resto de las mediciones de los parámetros y mediciones en sangre descritos a continuación. Luego se sacrificó el pez, se pesó y midió, y se colocó en una bolsa plástica etiquetada para las mediciones de sus órganos, y finalmente fueron congelados a -20° C hasta su uso.

7.3.4. Mediciones

7.3.4.1. En sangre

Hematocrito (Ht). Fue calculado utilizando el método de microhematocrito. Para ello, un tubo capilar fue llenado a 2/3 de sangre con anticoagulante; fue sellado y centrifugado por 5 min a 14,000 G; se reportó en porcentaje el paquete de células del volumen total por medición directa (Stoskopf, 1993).

Proteína plasmática total (TP). Se obtuvo la proteína total del plasma sanguíneo mediante un refractómetro (ATAGO* SPR-Ne, Japón) (Breazile *et al.*, 1982).

Hemoglobina (Hb). La Hb en los eritrocitos fue determinada según Baer and Krause (1968) obteniendo el volumen del paquete celular (VPC) y dividiéndolo entre tres.

Conteo de células blancas (WBC) y células rojas (RBC). Se realizó utilizando una cámara de Neubauer, se preparó la solución de Natt-Herrick (apéndice A) como diluyente para la sangre y se utilizó un microscopio óptico para la observación celular (Stoskopf, 1993).

Una vez determinados los valores antes mencionados, se calcularon los siguientes índices: hemoglobina corpuscular media (MCH) y volumen corpuscular medio (MCV); utilizando fórmulas ya establecidas (Stoskopf, 1993).

Glucosa. Fue determinada colocando una gota de sangre sin anticoagulante en un cubreobjetos de cristal y tocada con la orilla de arriba de las tiras One Touch[®], utilizando el lector One Touch Ultra Meter (Lifescan, Milpitas, California) (Evans, 2003).

Producción de radicales oxidativos. La técnica que se empleó fue la basada en la producción de anión superóxido (O_2^-), utilizando el NBT para medir la explosión respiratoria de las células fagocíticas. Para ello, 50 μ L de sangre con EDTA fueron mezcladas con 50 μ L de NBT (0.2% peso/volumen) en un cubreobjetos de cristal. Los cubreobjetos fueron incubados en una cámara húmeda a temperatura ambiente por 45 min. Durante este periodo el NBT se reduce a causa del O_2^- en un insoluble azul formazán. Posterior a la incubación, los cubreobjetos fueron lavados suavemente con solución buffer salina fosfatada y fijados con metanol. Los cubreobjetos se colocaron volteados sobre un portaobjetos con una gota de NBT. Se contaron las células teñidas de azul en 20 campos utilizando un microscopio compuesto a 40x (Yildirim *et al.*, 2003).

IgM. La proteína total sanguínea se obtuvo mediante un equipo comercial (Bio-Rad[®], EE.UU) determinando el contenido de IgM, precipitando el sobrenadante, previamente obtenido con sulfato de Zinc (0.7 mM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, pH =5.8); finalmente el contenido fue determinado por diferencia entre las proteínas totales (Rohlenová *et al.*, 2011).

Actividad fagocítica (PA). La sangre con anticoagulante se utilizó para determinar la actividad fagocitaria; previamente se contó con 30×10^8 células/mL de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923; apéndice B) inactivadas a 121° C/15 min, determinando su concentración por el método turbidimétrico de McFarland (apéndice C), y almacenadas a 4° C; se utilizaron 50 μ L de sangre con EDTA y 50 μ L de *S. aureus* inactivo (30×10^8 células/mL) y se colocaron en un microtubo; se dejó incubar a temperatura del cuarto por 30 min, se añadieron 150 μ L de solución amortiguadora con fosfato (PBS) (apéndice D) frío y las muestras fueron centrifugadas a 300 G por 5 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se realizó un frotis con el sedimento; se dejó secar al aire, posteriormente fue teñido con la solución Giemsa y las células se contaron usando un microscopio óptico. Se obtuvo la tasa de actividad fagocítica (PR) y el índice fagocítico (PI) mediante las siguientes fórmulas (Zhu *et al.*, 2012):

$$PR = [100 \times (\text{leucocitos con capacidad fagocítica}) \times (\text{leucocitos totales})^{-1}].$$

$PI = [(\text{número de } S. aureus \text{ fagocitados}) \times (\text{leucocitos con capacidad fagocítica})^{-1}]$.

7.3.4.2. En órganos

Tamaño del bazo. El órgano fue extraído y pesado con una báscula de precisión (0.001g) para obtener el Índice bazo-somático (SSI), calculado con la siguiente fórmula (Rohlenová *et al.*, 2011):

$$SSI = [\text{peso del bazo (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100].$$

Tamaño del riñón anterior. El órgano fue extraído y pesado con una báscula de precisión (0.001g) para obtener el Índice nefro-somático (NSI), calculado con la siguiente fórmula (Rohlenová *et al.*, 2011):

$$NSI = [\text{peso del riñón anterior (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100].$$

Luego de ser pesados se utilizó NBT para medir la explosión respiratoria de las células fagocíticas en muestras de bazo y riñón anterior, basado en la producción de anión superóxido (O_2^-). Para ello se obtuvo una muestra de bazo y riñón anterior utilizando el método de aproximación ventral (Noga, 2000). Se realizó una impronta de riñón anterior y bazo (Jiménez-Guzmán, 2007) en una laminilla para posteriormente ser teñidos con NBT, haciendo la lectura de los leucocitos al microscopio (Chen *et al.*, 2001).

7.3.5. Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas entre los valores obtenidos de las peceras tratadas con β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico comparadas contra las peceras del grupo control, no siendo cada animal individual la unidad experimental, sino

cada pecera con animales. Se utilizaron pruebas de normalidad (Kolmogórov-Smirnov) y homocedasticidad de varianza (Bartlett) previos al análisis de ANOVA de dos vías, tomando como factores los tratamientos y el tiempo transcurrido por semana, se utilizó la prueba de Tukey HSD como prueba posterior al ANOVA para establecer diferencias entre tratamientos. Los datos que no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianza fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis considerando para todas las pruebas diferencias significativas al nivel de probabilidad de $\alpha=0.05$. Se utilizó el software comercial STATISTICA* para el procesamiento de los datos.

7.4. Resultados

Durante las cinco semanas de tratamiento se contó con una temperatura media de 27.3 ± 0.8 ; el oxígeno disuelto mostró un valor de 6.4 ± 0.3 , el pH se mantuvo constante en 7.5, mientras que no fueron detectados nitratos y nitritos.

7.4.1. Evaluar el efecto de los β -glucanos (1,3 / 1,6) en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

Los datos obtenidos de las lecturas del hematocrito y hemoglobina de los acuarios control y los tratados con β -glucanos (1,3 / 1,6) cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA; únicamente se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las semanas (Tabla 6) y no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos ni en la interacción semana-grupo.

El grupo control tuvo un mayor valor en la proteína total presente en plasma sanguíneo; sin embargo, dicho valor no mostró diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) con el resto de los tratamientos o entre las cinco semanas de duración del experimento en el ANOVA (Tabla 6); del mismo modo que los parámetros anteriores, los supuestos del ANOVA fueron cumplidos naturalmente.

Los parámetros obtenidos en los conteos leucocitarios fueron transformados con Log10 para cumplir con los supuestos del ANOVA, este análisis no mostró diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los grupos de tratamiento ni en la interacción semana-grupo; sin embargo, si se observaron en el análisis de las semanas formando cuatro grupos homogéneos (Tabla 6) con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); de la misma manera, se encontraron diferencias al comparar todos los grupos de cada una de las semanas entre sí (Figura 7).

Tabla 6

Parámetros hematológicos en tratamientos con β -glucanos (1,3 / 1,6); Media \pm EE.
Hematocrito (Ht) %, Proteínas plasmáticas totales (TP) g/100 mL, Hemoglobina (Hb) g/dL, Conteo de células blancas (WBC) células $\times 10^6$ /mL, Conteo de células rojas (RBC) células $\times 10^5$ /mL, Glucosa mg/dL, Hemoglobina corpuscular media (MCH) pg, volumen corpuscular medio (MCV) fL, Células fagocíticas en sangre reactivas a nitroazul de tetrazolio (FCB/NBT) células/campo, Inmunoglobulina M (IgM) g/L, Índice bazo-somático (SSI), Índice nefro-somático (NSI), Tejido de impronta de bazo reactivo a nitroazul de tetrazolio (NBT/bazo), Tejido de impronta de riñón anterior reactivo a nitroazul de tetrazolio (NBT/RA).

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
Ht	c	bc	ab	ab	a
-Control	36.67 \pm 2.40	31.67 \pm 1.45	27.33 \pm 2.73	25.67 \pm 2.05	26.33 \pm 0.73
-BG 0.5	33.00 \pm 4.04	31.00 \pm 3.22	29.00 \pm 2.52	29.33 \pm 1.85	26.33 \pm 1.33
-BG 0.1	28.33 \pm 3.29	30.33 \pm 2.19	27.00 \pm 4.36	29.00 \pm 3.60	27.00 \pm 2.52
-BG 0.05	35.67 \pm 4.09	31.50 \pm 2.18	28.00 \pm 1.53	25.00 \pm 2.64	22.83 \pm 1.36
TP	a	a	a	a	a
-Control	4.47 \pm 0.10	4.00 \pm 0.06	3.53 \pm 0.17	3.07 \pm 0.10	3.60 \pm 0.12
-BG 0.5	4.07 \pm 0.25	3.73 \pm 0.19	3.80 \pm 0.42	3.33 \pm 0.08	3.53 \pm 0.04
-BG 0.1	3.20 \pm 0.47	3.93 \pm 0.23	3.47 \pm 0.27	3.73 \pm 0.32	3.90 \pm 0.19
-BG 0.05	3.80 \pm 0.23	3.50 \pm 0.23	3.27 \pm 0.10	3.63 \pm 0.21	2.97 \pm 0.16
Hb	c	bc	ab	ab	a
-Control	12.22 \pm 0.80	10.56 \pm 0.48	9.11 \pm 0.91	8.56 \pm 0.68	8.78 \pm 0.24
-BG 0.5	11.00 \pm 1.35	10.33 \pm 1.07	9.67 \pm 0.84	9.78 \pm 0.62	8.78 \pm 0.44
-BG 0.1	9.44 \pm 1.10	10.11 \pm 0.73	9.00 \pm 1.45	9.67 \pm 1.20	9.00 \pm 0.84
-BG 0.05	11.89 \pm 1.36	10.50 \pm 0.73	9.33 \pm 0.51	8.33 \pm 0.88	7.61 \pm 0.46
WBC	b	a	ac	a	bc
-Control	15.93 \pm 9.60*	114.7 \pm 52.53	87.48 \pm 18.39	211.3 \pm 112.1*	42.15 \pm 20.93
-BG 0.5	17.56 \pm 6.55*	112.3 \pm 26.01	204.6 \pm 137.8	140.0 \pm 15.53	42.96 \pm 30.70
-BG 0.1	16.89 \pm 5.08*	101.4 \pm 24.43	106.7 \pm 54.93	138.2 \pm 22.51	81.93 \pm 26.30
-BG 0.05	50.52 \pm 28.11	153.7 \pm 62.82	104.4 \pm 42.71	289.3 \pm 131.1*	32.00 \pm 7.98
RBC	a	ab	b	ab	ab
-Control	21.50 \pm 2.55	16.17 \pm 1.44	13.53 \pm 5.11	17.20 \pm 3.79	16.10 \pm 2.70
-BG 0.5	22.13 \pm 1.76	12.80 \pm 3.60	11.60 \pm 4.27	16.80 \pm 1.30	15.63 \pm 1.09
-BG 0.1	19.97 \pm 1.62	18.87 \pm 1.55	13.87 \pm 5.13	19.50 \pm 1.94	19.17 \pm 0.84
-BG 0.05	21.80 \pm 3.78	15.23 \pm 2.97	13.07 \pm 1.51	14.63 \pm 2.03	12.30 \pm 0.76
MCH	a	a	a	a	a
-Control	59.10 \pm 9.54	66.68 \pm 7.90	91.14 \pm 32.41	56.74 \pm 16.61	58.75 \pm 12.66
-BG 0.5	49.98 \pm 6.32	111.3 \pm 54.49	113.0 \pm 42.01	58.79 \pm 4.96	56.80 \pm 5.39
-BG 0.1	47.03 \pm 2.10	54.58 \pm 7.24	117.5 \pm 71.30	50.50 \pm 7.15	47.46 \pm 6.03
-BG 0.05	56.30 \pm 6.40	73.32 \pm 11.36	74.06 \pm 11.70	57.51 \pm 3.05	61.94 \pm 1.62
MCV	a	a	a	a	a
-Control	177.3 \pm 28.63	200.0 \pm 23.70	273.4 \pm 97.23	170.2 \pm 49.84	176.2 \pm 37.96
-BG 0.5	150.0 \pm 18.94	334.0 \pm 163.4	339.1 \pm 126.1	176.4 \pm 14.88	170.4 \pm 16.17

Tabla 6. (Continuación)

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
-BG 0.1	141.1 ± 6.32	163.7 ± 21.73	139.9 ± 33.43	151.5 ± 21.45	142.4 ± 18.10
-BG 0.05	168.9 ± 19.21	220.0 ± 34.08	222.2 ± 35.09	172.5 ± 9.16	185.8 ± 4.86
Glucosa	a	a	a	a	a
-Control	54.67 ± 9.17	42.67 ± 2.33	53.67 ± 3.18	33.33 ± 4.66	47.00 ± 14.57
-BG 0.5	51.33 ± 8.74	50.33 ± 2.60	60.33 ± 7.53	49.33 ± 6.36	56.33 ± 5.36
-BG 0.1	48.67 ± 11.47	51.33 ± 1.20	58.67 ± 10.17	58.67 ± 8.37	55.33 ± 4.34
-BG 0.05	51.00 ± 4.93	49.67 ± 7.26	60.67 ± 3.76	46.00 ± 5.51	58.67 ± 8.19
FCB/NBT**	c	bc	d	ab	a
-Control	0.07 ± 0.05*	0.08 ± 0.05*	0.45 ± 0.03*	0.02 ± 0.02*	0*
-BG 0.5	0.15 ± 0.06	0.07 ± 0.02	0.57 ± 0.20*	0.10 ± 0.05	0*
-BG 0.1	0.25 ± 0.08*	0.08 ± 0.06*	0.42 ± 0.02*	0*	0.02 ± 0.02*
-BG 0.05	0.22 ± 0.19	0.10 ± 0.03	0.47 ± 0.14*	0*	0.02 ± 0.02*
IgM	a	a	a	a	a
-Control	21.39 ± 4.58	8.02 ± 4.59	15.75 ± 4.44	16.30 ± 3.99	8.74 ± 3.80
-BG 0.5	11.83 ± 5.20	7.91 ± 1.17	18.16 ± 2.21	17.06 ± 0.24	19.41 ± 2.15
-BG 0.1	18.42 ± 5.20	19.27 ± 3.62	16.77 ± 3.86	13.21 ± 3.92	17.19 ± 3.15
-BG 0.05	13.72 ± 4.57	15.12 ± 1.80	22.98 ± 1.31	18.45 ± 5.32	13.83 ± 1.81
SSI	ab	a	ab	a	b
-Control	0.063 ± 0.003	0.066 ± 0.007	0.054 ± 0.002	0.093 ± 0.034	0.049 ± 0.007
-BG 0.5	0.064 ± 0.002	0.070 ± 0.002	0.065 ± 0.003	0.060 ± 0.004	0.058 ± 0.008
-BG 0.1	0.058 ± 0.002	0.066 ± 0.010	0.054 ± 0.005	0.060 ± 0.008	0.054 ± 0.009
-BG 0.05	0.060 ± 0.009	0.073 ± 0.010	0.051 ± 0.005	0.090 ± 0.026	0.046 ± 0.008
NSI	a	ab	b	ab	ab
-Control	0.16 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.22 ± 0.04
-BG 0.5	0.20 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.14 ± 0.05	0.22 ± 0.02
-BG 0.1	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.05	0.27 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.23 ± 0.01
-BG 0.05	0.18 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.20 ± 0.02
NBT bazo**	ab	ab	b	ab	a
-Control	1.11 ± 0.22	0.56 ± 0.22	0.78 ± 0.22	0.44 ± 0.29	0.22 ± 0.11
-BG 0.5	0.56 ± 0.56	0.44 ± 0.11	1.11 ± 0.59	0.89 ± 0.73	0.11 ± 0.11
-BG 0.1	0.44 ± 0.29	0.22 ± 0.22	0.67 ± 0.19	0.33 ± 0.19	0.22 ± 0.22
-BG 0.05	0.33 ± 0.19	0.22 ± 0.22	1.44 ± 0.78	1.33 ± 1.00	0.11 ± 0.11
NBT RA**	ab	ab	b	a	a
-Control	0.78 ± 0.22	0.56 ± 0.56	2.22 ± 0.99	0.56 ± 0.40	0.56 ± 0.56
-BG 0.5	0.33 ± 0.19	0.78 ± 0.22	2.56 ± 1.79	0.56 ± 0.11	0.11 ± 0.11
-BG 0.1	1.44 ± 1.44	0.33 ± 0.19	1.22 ± 0.62	0.11 ± 0.11	0.22 ± 0.11
-BG 0.05	1.67 ± 1.02	0.78 ± 0.29	1.33 ± 0.19	0.22 ± 0.11	0

* Diferencias estadísticas (p<0.05) con al menos un grupo de las diferentes semanas.

** Medias de 3 repeticiones por acuario.

Diferentes letras indican grupos homogéneos diferentes (p<0.05) entre las semanas.

El conteo de células rojas (RBC) no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) entre los grupos ni en la interacción semana-grupo, sin embargo, al comparar las semanas si hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$); formando dos grupos homogéneos (Tabla 6), los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA.

Para llevar a cabo el análisis de los valores obtenidos para MCH y MCV (Tabla 6) fue necesario transformar los datos utilizando la función $1/\text{Log}10$ y así cumplir con los supuestos del ANOVA en ambos parámetros; no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre grupos tratados o entre las semanas en ninguno de los tratamiento, y tampoco en la interacción semana-grupo.

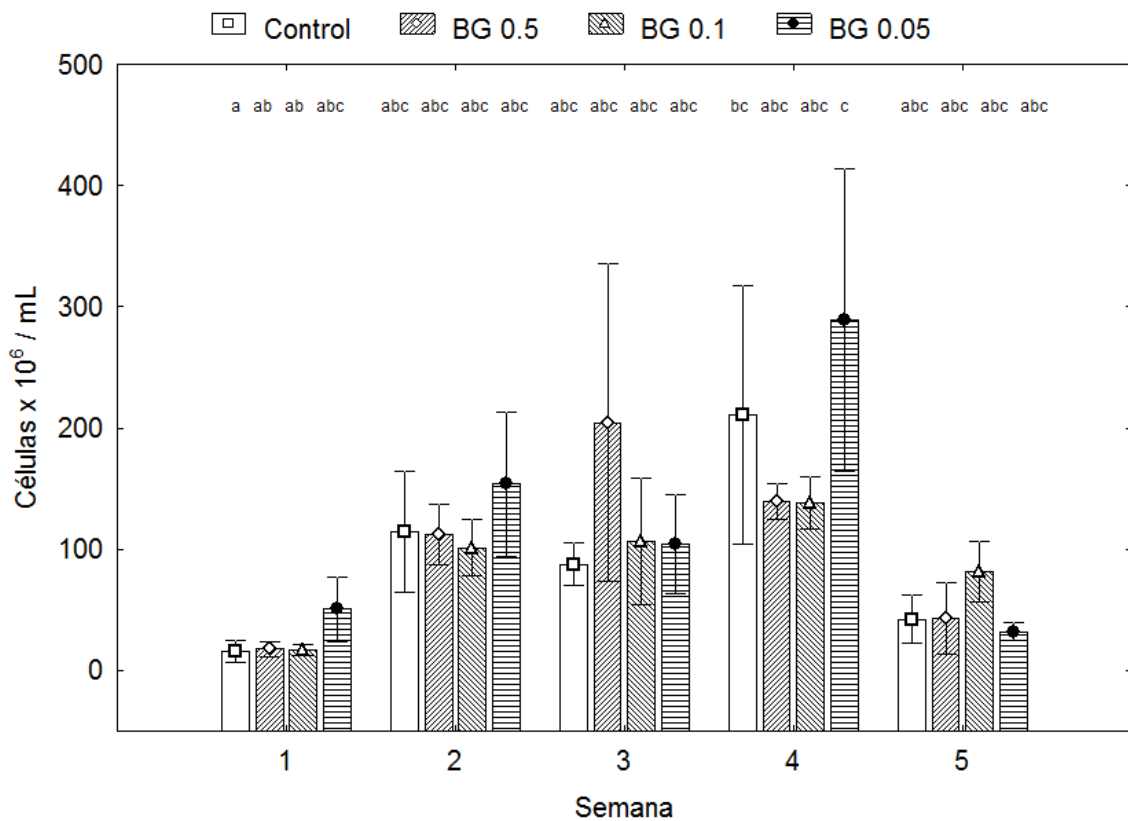


Figura 7. Comparativo de dietas que utilizaron β -glucanos (1,3 / 1,6) al 0.5% (BG 0.5), 0.1% (BG 0.1) y 0.05% (BG 0.05) con la dieta control en el conteo leucocitario teñido con solución Natt-Herrick. Distintas letras indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre grupos.

El grupo que tuvo un menor valor en la lectura de glucosa en sangre fue el grupo control en la semana 4; mientras que el de mayor valor correspondió al grupo que utilizó 0.05% de β -glucanos (1,3 / 1,6) en la semana 3 (Tabla 6). A pesar de la diferencia mostrada en los valores antes mencionados, los datos no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre los grupos, semanas o en la interacción semana-grupo; los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA.

La reacción con nitroazul de tetrazolio en sangre a través de la observación de las células fagocíticas sanguíneas (FC/NBT) directamente en el microscopio (40 x) permitió observar diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en el análisis de las semanas (Tabla 6); mientras que no se observaron en el de grupos o en la interacción semana-grupo; sin embargo, en el análisis de Tukey HSD de todos los grupos si se observaron diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$). Para cumplir con los supuestos del ANOVA los datos fueron transformados con la ecuación: \sqrt{x} .

El análisis de los datos de IgM cumplió naturalmente con los supuestos del ANOVA y no se observó diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre los grupos tratados o entre las semanas de tratamiento (Tabla 6), tampoco en la interacción semana-grupo.

La tasa fagocítica y el índice fagocítico no fueron calculados en la primer semana debido a causas meteorológicas de fuerza mayor que ocasionaron la pérdida de las muestras; el análisis procedió de la semana 2 a la semana 5. Los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA; en el índice fagocítico no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre los grupos, entre las semanas de tratamiento o en la interacción semana-grupo (Figura 8b). Al hacer referencia a la tasa fagocítica se pueden observar diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en el análisis semanal únicamente, formando grupos homogéneos (Figura 8a).

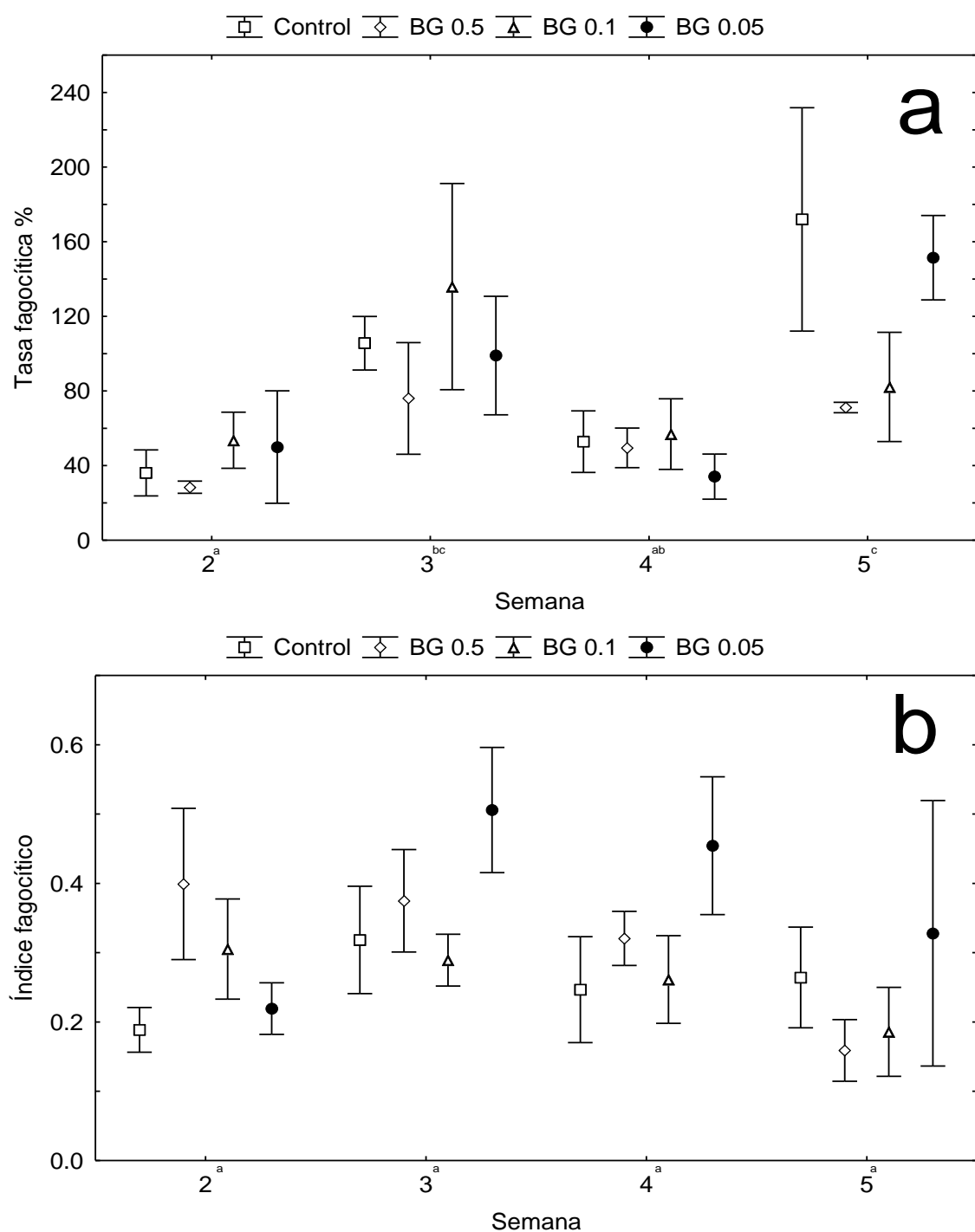


Figura 8. Actividad fagocítica del bague de canal (*I. punctatus*) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) utilizando dietas suplementadas con β -glucanos (1,3 / 1,6) (0.5, 0.1, 0.05%). (a) tasa fagocítica. (b) índice fagocítico. Distintas letras indican grupos homogéneos semanales estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

Los datos obtenidos del índice bazo-somático fueron transformados con Log10 para cumplir con los supuestos del ANOVA; se observó un incremento significativo ($p<0.05$) de dicho índice durante la semana 4 (Tabla 6) en el análisis semanal. Los grupos y la interacción semana-grupo no mostraron diferencias estadísticas significativas.

El índice nefro-somático (NSI) mostró diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en las semanas de tratamiento (Tabla 6), mientras que no se observaron en el análisis por grupo o en la interacción semana-grupo; los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA.

Los datos obtenidos de la observación del tejido de la impronta de bazo (NBT/bazo) y de riñón anterior (NBT/RA) reactivo a nitroazul de tetrazolio fueron transformados con la función $\text{Log}_{10}x+0.5$ cumpliendo así con los supuestos del ANOVA; diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) se observaron solamente en el análisis por semana (Tabla 6) en ambos parámetros, siendo la semana número 3 la que mayor reactividad demostró.

7.4.2. Evaluar el efecto del ácido ascórbico en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

Los datos obtenidos de las lecturas del hematocrito y hemoglobina de los acuarios control y los tratados con ácido ascórbico cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA; únicamente se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las semanas (Tabla 7), pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos ni en la interacción semana-grupo.

El grupo control tuvo el mayor valor en la proteína total presente en plasma sanguíneo, sin embargo dicho valor no mostró diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) con el resto de los tratamientos; se observaron diferencias estadísticas significativas entre las semanas de duración del experimento en el ANOVA (Tabla 7); del mismo modo que los parámetros anteriores, los supuestos del ANOVA fueron cumplidos naturalmente.

Los parámetros obtenidos en los conteos leucocitarios fueron transformados con Log10 para cumplir con los supuestos del ANOVA; en el análisis de dicha transformación no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los grupos de tratamiento ni en la interacción semana-grupo; sin embargo, al formar cuatro grupos homogéneos (Tabla 7) si se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el análisis de las semanas; de la misma manera, se encontraron diferencias al comparar todos los grupos de cada una de las semanas entre sí (Figura 9).

El conteo de células rojas (RBC) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) en la interacción semana-grupo, sin embargo, al comparar grupos o semanas entre sí (Tabla 7), si hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Se formaron dos grupos homogéneos al comparar las dietas; el control compartió grupo homogéneo; por un lado con los menores con AA 500 y AA 750 y por otro lado con AA 250 que mostró un conteo superior. Los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA.

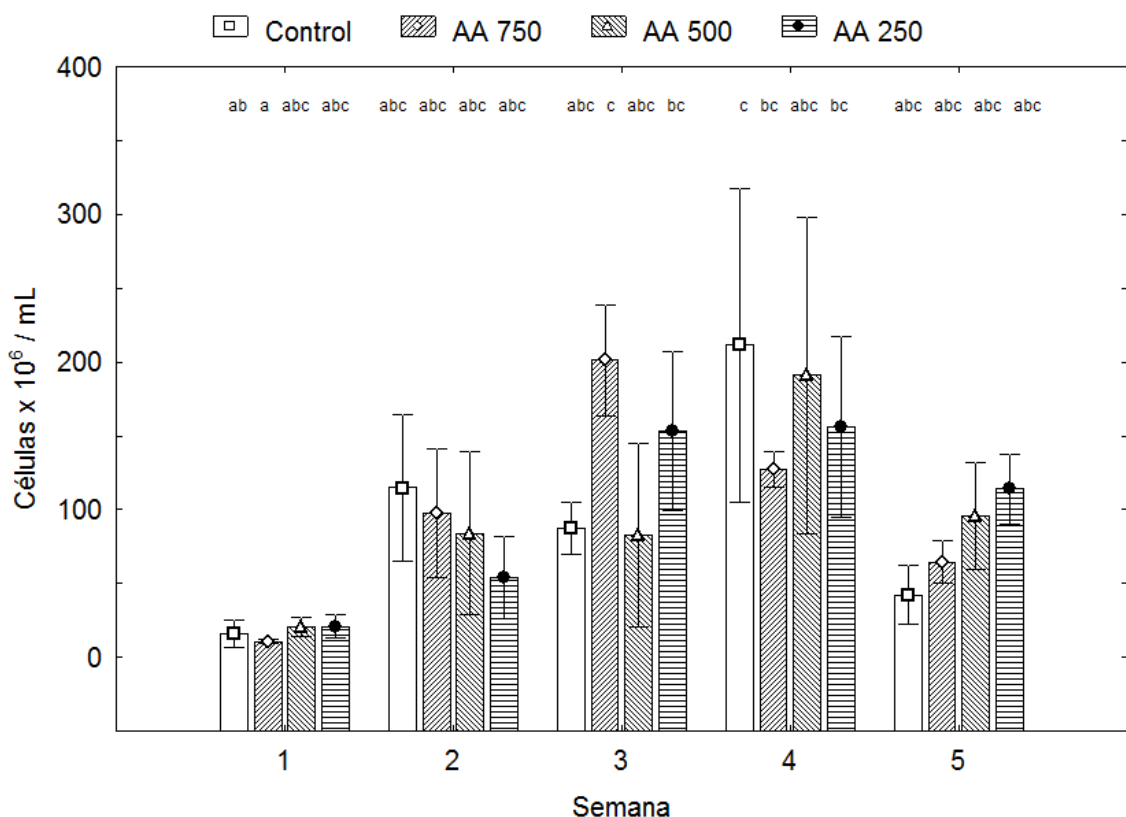


Figura 9. Comparativo de dietas que utilizaron ácido ascórbico a razón de 750 (AA 750), 500 (AA 500) y 250 mg/kg (AA 250) con la dieta control en el conteo leucocitario teñido con solución Natt-Herrick. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.

Para llevar a cabo el análisis de los valores obtenidos para MCH y MCV (Tabla 7) fue necesario transformar los datos utilizando la función $1/\text{Log}10$ y así cumplir con los supuestos del ANOVA en ambos parámetros; sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre grupos tratados o entre semanas de ninguno de los tratamiento, y tampoco en la interacción semana-grupo.

El grupo que tuvo un menor valor en la lectura de glucosa en sangre fue el grupo control en la semana 4; mientras que el de mayor valor correspondió al grupo que utilizó 250 mg/L de ácido ascórbico en la semana 5 (Tabla 7). A pesar de la diferencia mostrada en los valores antes mencionados, los datos no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los grupos o en la interacción semana-grupo; sin embargo,

se formaron distintos grupos homogéneos ($p < 0.05$) en el análisis por semana (Tabla 7); los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA.

La reacción con nitroazul de tetrazolio en sangre a través de la observación de las células fagocíticas sanguíneas (FC/NBT) permitió observar diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el análisis de las semanas (Tabla 7); mientras que no se observaron en el de grupos o en la interacción semana-grupo; sin embargo, en el análisis de Tukey HSD de todos los grupos si se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Para cumplir con los supuestos del ANOVA los datos fueron transformados con la ecuación: \sqrt{x} .

El análisis de los datos de IgM cumplió naturalmente con los supuestos del ANOVA y no se observó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre los grupos tratados o entre las semanas de tratamiento (Tabla 7), y tampoco en la interacción semana-grupo.

La tasa fagocítica (PR) y el índice fagocítico (PI) no fueron calculados en la primera semana debido a causas meteorológicas de fuerza mayor que ocasionaron la pérdida de las muestras, por lo que el análisis procedió de la semana 2 a la semana 5. Los datos para el análisis de ANOVA de PR y el PI cumplieron naturalmente con los supuestos; a este respecto en la tasa fagocítica no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los grupos, entre las semanas de tratamiento o en la interacción semana-grupo (Figura 10a). Al hacer referencia al índice fagocítico se pueden observar diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el análisis semanal únicamente (Figura 10b).

Los datos obtenidos del índice bazo-somático fueron transformados con Log10 para cumplir con los supuestos del ANOVA; se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de dicho índice durante la semana 4 (Tabla 7) en el análisis semanal. Los grupos y la interacción semana-grupo no mostraron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 7

Parámetros hematológicos en tratamientos con ácido ascórbico; Media \pm EE.
Hematocrito (Ht) %, Proteínas plasmáticas totales (TP) g/100 mL, Hemoglobina (Hb) g/dL, Conteo de células blancas (WBC) células $\times 10^6$ /mL, Conteo de células rojas (RBC) células $\times 10^5$ /mL, Glucosa mg/dL, Hemoglobina corpuscular media (MCH) pg, volumen corpuscular medio (MCV) fL, Células fagocíticas reactivas al nitroazul de tetrazolio (FC/NBT) células/campo, Inmunoglobulina M (IgM) g/L, Índice bazo-somático (SSI), Índice nefro-somático (NSI), Tejido de impronta de bazo reactivo a nitroazul de tetrazolio (NBT/bazo), Tejido de impronta de riñón anterior reactivo a nitroazul de tetrazolio (NBT/RA).

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
Ht	b	a	a	a	a
-Control	36.67 \pm 2.40*	31.67 \pm 1.45	27.33 \pm 2.73	25.67 \pm 2.05	26.33 \pm 0.73
-AA 750	34.33 \pm 2.33*	26.17 \pm 3.37	27.33 \pm 3.85	29.17 \pm 2.81	25.33 \pm 1.36
-AA 500	30.33 \pm 1.67	27.67 \pm 2.60	21.67 \pm 5.05	27.17 \pm 0.73	24.67 \pm 1.92
-AA 250	34.33 \pm 1.45*	29.00 \pm 1.73	30.33 \pm 0.88	27.17 \pm 1.48	23.83 \pm 1.64*
TP	b	ab	ab	a	ab
-Control	4.47 \pm 0.18	4.00 \pm 0.10	3.53 \pm 0.29	3.07 \pm 0.18	3.60 \pm 0.20
-AA 750	4.00 \pm 0.12	3.13 \pm 0.49	3.33 \pm 0.35	3.53 \pm 0.17	3.50 \pm 0.40
-AA 500	3.73 \pm 0.07	3.50 \pm 0.30	3.20 \pm 0.12	3.37 \pm 0.14	3.57 \pm 0.03
-AA 250	3.67 \pm 0.35	4.37 \pm 0.37	4.00 \pm 0.23	3.17 \pm 0.35	3.30 \pm 0.27
Hb	b	a	a	a	a
-Control	12.22 \pm 0.80*	10.56 \pm 0.48	9.11 \pm 0.91	8.56 \pm 0.68	8.78 \pm 0.24
-AA 750	11.44 \pm 0.78*	8.72 \pm 1.13	9.11 \pm 1.28	9.72 \pm 0.94	8.44 \pm 0.46
-AA 500	10.11 \pm 0.55	9.22 \pm 0.87	7.22 \pm 1.68	9.06 \pm 0.24	8.22 \pm 0.64
-AA 250	11.44 \pm 0.48*	9.67 \pm 0.58	10.11 \pm 0.29	9.06 \pm 0.50	7.94 \pm 0.55*
WBC	b	a	a	a	a
-Control	15.93 \pm 9.59*	114.7 \pm 52.53	87.48 \pm 18.39	211.3 \pm 112.2*	42.15 \pm 20.93
-AA 750	10.44 \pm 1.43*	97.78 \pm 45.89	201.3 \pm 39.62*	127.3 \pm 12.35*	64.44 \pm 14.91
-AA 500	20.37 \pm 6.82	84.15 \pm 58.00	82.44 \pm 65.56	191.0 \pm 113.0	95.70 \pm 38.31
-AA 250	20.96 \pm 7.94	53.85 \pm 29.07	152.9 \pm 56.59*	156.0 \pm 64.37*	114.1 \pm 25.12
RBC	b	ab	a	a	ab
-Control	21.50 \pm 2.55	16.17 \pm 1.44	13.53 \pm 5.11*	17.20 \pm 3.79	16.10 \pm 2.70
-AA 750	19.70 \pm 0.49	16.43 \pm 2.25	13.87 \pm 1.53*	14.37 \pm 0.82*	12.63 \pm 4.35*
-AA 500	13.97 \pm 1.87*	18.27 \pm 3.13	10.43 \pm 1.03*	12.20 \pm 2.94*	19.77 \pm 4.39
-AA 250	29.90 \pm 2.75*	17.97 \pm 3.05	18.40 \pm 0.38	18.93 \pm 2.47	15.87 \pm 0.33
MCH	a	a	a	a	a
-Control	59.10 \pm 9.54	66.68 \pm 7.90	91.14 \pm 32.41	56.74 \pm 16.61	58.75 \pm 12.66
-AA 750	49.08 \pm 12.67	55.60 \pm 10.57	68.08 \pm 14.89	68.68 \pm 9.75	94.58 \pm 41.79
-AA 500	73.04 \pm 6.68	52.06 \pm 5.94	68.18 \pm 12.74	81.28 \pm 14.73	45.10 \pm 8.51
-AA 250	38.74 \pm 2.70	55.95 \pm 6.98	54.95 \pm 1.06	50.47 \pm 10.17	50.24 \pm 4.39
MCV	a	a	a	a	a
-Control	177.3 \pm 28.63	200.0 \pm 23.70	273.4 \pm 92.23	170.2 \pm 49.84	176.2 \pm 37.96
-AA 750	147.2 \pm 38.00	166.8 \pm 31.69	204.2 \pm 44.68	206.0 \pm 29.23	158.6 \pm 10.41
-AA 500	219.1 \pm 20.03	156.2 \pm 17.82	204.6 \pm 38.23	243.8 \pm 44.18	135.3 \pm 25.52

Tabla 7 (Continuación)

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
-AA 250	116.2 ± 8.09	167.9 ± 20.95	164.8 ± 3.20	151.4 ± 30.52	150.7 ± 13.16
Glucosa	ab	ab	b	a	ab
-Control	54.67 ± 9.17	42.67 ± 2.33	53.67 ± 3.18	33.33 ± 4.66	47.00 ± 14.57
-AA 750	58.67 ± 3.18	45.00 ± 6.66	54.67 ± 8.19	37.67 ± 1.67	37.67 ± 5.24
-AA 500	44.67 ± 13.12	52.33 ± 4.91	51.50 ± 2.04	36.33 ± 7.86	53.00 ± 5.86
-AA 250	51.00 ± 5.57	56.00 ± 8.54	47.67 ± 3.29	42.33 ± 4.98	67.67 ± 14.15
FC/NBT**	a	a	b	a	a
-Control	0.07 ± 0.05*	0.08 ± 0.05*	0.45 ± 0.03*	0.02 ± 0.02*	0*
-AA 750	0.08 ± 0.03*	0.02 ± 0.02*	0.50 ± 0.10*	0.02 ± 0.02*	0.03 ± 0.03*
-AA 500	0.05 ± 0.03*	0.05 ± 0*	0.50 ± 0.14*	0.02 ± 0.02*	0.02 ± 0.02*
-AA 250	0.02 ± 0.02*	0.02 ± 0.02*	0.47 ± 0.06*	0.02 ± 0.02*	0.03 ± 0.02*
IgM	a	a	a	a	a
-Control	21.39 ± 4.58	8.02 ± 4.59	15.75 ± 4.44	16.30 ± 3.99	8.74 ± 3.80
-AA 750	11.60 ± 4.39	10.48 ± 2.32	18.42 ± 4.15	19.87 ± 0.06	11.87 ± 2.62
-AA 500	13.69 ± 1.13	16.52 ± 3.44	13.86 ± 6.18	24.73 ± 6.56	15.36 ± 4.30
-AA 250	16.70 ± 6.32	12.17 ± 6.15	18.85 ± 4.31	16.66 ± 1.59	15.87 ± 4.18
SSI					
-Control	0.063 ± 0.003	0.066 ± 0.007	0.054 ± 0.002	0.093 ± 0.034	0.049 ± 0.007
-AA 750	0.065 ± 0.001	0.082 ± 0.013	0.056 ± 0.005	0.068 ± 0.009	0.063 ± 0.014
-AA 500	0.052 ± 0.011	0.060 ± 0.005	0.042 ± 0.010	0.095 ± 0.026	0.051 ± 0.001
-AA 250	0.067 ± 0.006	0.055 ± 0.006	0.058 ± 0.009	0.058 ± 0.006	0.049 ± 0.001
NSI	b	a	ab	a	a
-Control	0.16 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.22 ± 0.04
-AA 750	0.11 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.01
-AA 500	0.14 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.15 ± 0.06	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02
-AA 250	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.08	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.04
NBT/bazo**	ab	ab	b	a	a
-Control	1.11 ± 0.22	0.56 ± 0.22	0.78 ± 0.22	0.44 ± 0.29	0.22 ± 0.11
-AA 750	0.78 ± 0.40	0.44 ± 0.29	1.11 ± 0.48	0.11 ± 0.11	0.44 ± 0.44
-AA 500	0.89 ± 0.44	0.22 ± 0.11	1.00 ± 0.51	0.22 ± .011	0
-AA 250	0.56 ± 0.11	1.00 ± 0.51	1.00 ± 0.67	0.22 ± 0.11	0.44 ± 0.29
NBT/RA**	ab	ab	b	a	a
-Control	0.78 ± 0.22	0.56 ± 0.56	2.22 ± 0.99	0.56 ± 0.40	0.56 ± 0.56
-AA 750	0.78 ± 0.44	1.22 ± 0.78	1.56 ± 0.89	0.67 ± 0.19	0
-AA 500	0.89 ± 0.11	0.33 ± 0.19	0.78 ± 0.29	0.56 ± 0.29	0.33 ± 0.33
-AA 250	0.67 ± 0.19	0.78 ± 0.48	1.56 ± 0.80	0.22 ± 0.22	0.33 ± 0.19

* Diferencias estadísticas (p<0.05) con al menos un grupo de las diferentes semanas.

** Medias de 3 repeticiones por tratamiento.

Diferentes letras indican grupos homogéneos diferentes (p<0.05) entre las semanas.

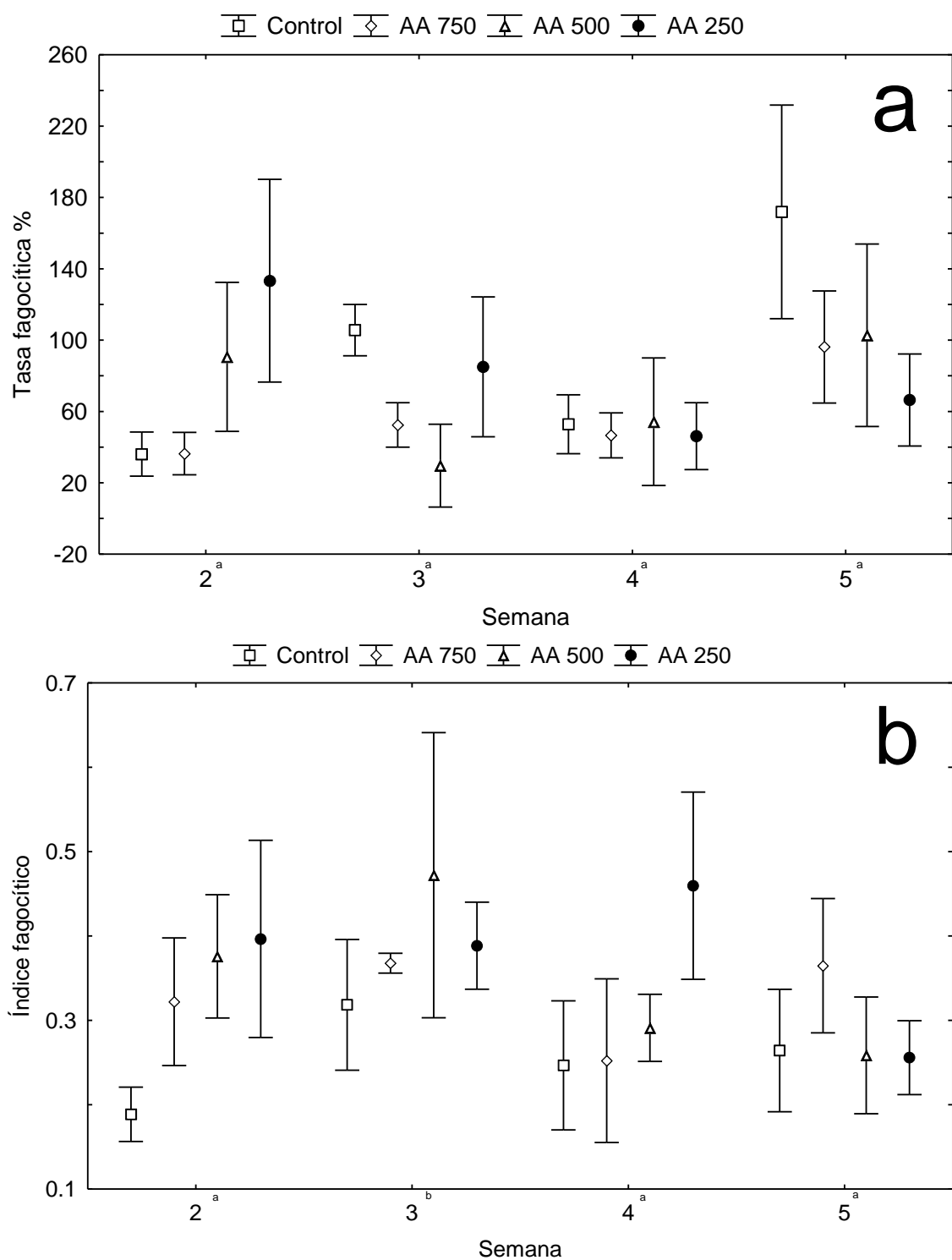


Figura 10. Actividad fagocítica del bagre de canal (*I. punctatus*) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) utilizando dietas suplementadas con ácido ascórbico (750, 500, 250 mg/kg). (a) tasa fagocítica. (b) índice fagocítico. Distintas letras indican grupos homogéneos semanales estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

El índice bazo-somático (SSI) no cumplió con los supuestos del ANOVA, por lo que fue analizado con la prueba de Kruskal-Wallis para los grupos, semanas y semana-grupo, mostrando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) únicamente entre las distintas semanas, siendo la semana número 4 la que mostró mayores valores (Figura 11).

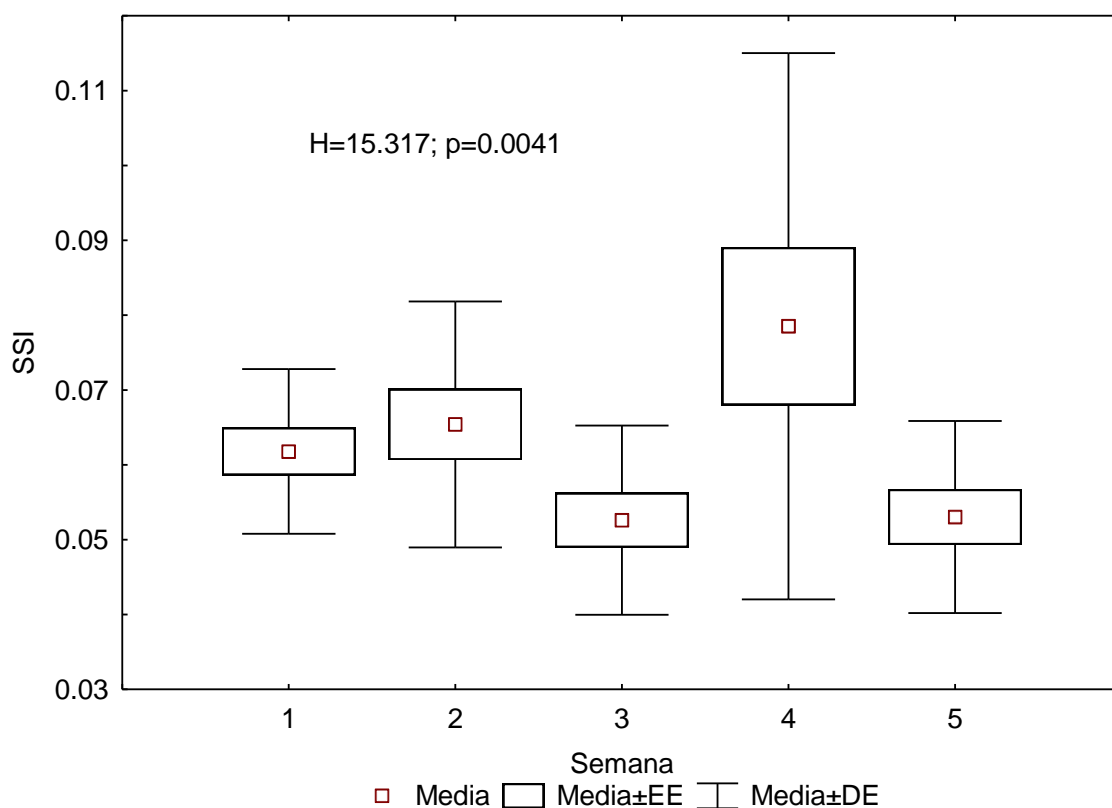


Figura 11. Valores del índice bazo-somático (SSI) semanales de la prueba Kruskal-Wallis en dietas de bagre de canal (*I. punctatus*) adicionadas con 250, 500 y 750 mg/kg de ácido ascórbico.

El índice nefro-somático (NSI) mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en las semanas de tratamiento (Tabla 7), mientras que no se observaron en el análisis por grupo o en la interacción semana-grupo; los datos cumplieron naturalmente con los supuestos del ANOVA.

Los datos obtenidos de la observación del tejido de la impronta de bazo (NBT/bazo) y de riñón anterior (NBT/RA) reactivo a nitroazul de tetrazolio cumplieron con los supuestos del ANOVA; solamente se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el análisis por semana (Tabla 7) en ambos parámetros, siendo la semana número 3 la que mayor reactividad demostró.

7.5. Discusión

7.5.1. Evaluar el efecto de los β -glucanos (1,3 / 1,6) en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

El uso de inmunoestimulantes naturales como los β -glucanos ha mejorado la producción en la acuicultura, causando un efecto positivo sobre los cultivos piscícolas, y demostrando su capacidad de modificar la respuesta biológica sobre algunos parámetros hematológicos e inmunológicos (Bohn and BeMiller, 1995); con ello se puede lograr mejorar la respuesta de los organismos cultivados hacia agentes infecciosos. Por otra parte, son compuestos amigables con el ambiente, es decir, no contaminan y son biodegradables; finalmente, al ayudar a combatir diversas enfermedades se reduce el uso de agentes químicos que perjudican el medio ambiente.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran un incremento general en algunos parámetros inmunológicos y hematológicos, principalmente durante las semanas 3 y 4 de los distintos tratamientos con β -glucanos (1,3 / 1,6). La dieta que mejor inmunoestimulación produjo fue la que utilizó una concentración de 0.05% de β -glucanos (1,3 / 1,6), obteniendo un conteo superior estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de células blancas durante la semana número 4 al resto de los tratamientos. Sin embargo, en algunos parámetros hematológicos como el hematocrito, la hemoglobina y el conteo de células rojas se mostró un incremento durante la primera semana de tratamiento; en este sentido, Del Rio-Zaragoza *et al.*, (2011) reportan incremento leucocitario utilizando la misma concentración (0.05%) de β -glucanos (1,3 / 1,6), así como un mayor número de células rojas durante la primer semana de tratamiento en pargos rosados (*Lutjanus guttatus*).

La glucosa fue medida a través de tiras reactivas como una prueba indirecta de evaluación del estrés al que son sometidos los organismos; a mayor estrés, mayor es la cantidad de cortisol en sangre, lo que se traduce a su vez en un incremento de glucosa

circulante a través del organismo haciendo a los peces más susceptibles a posibles enfermedades (Barandica and Tort, 2008). En este sentido, al parecer los niveles de glucosa en sangre mantenidos durante el experimento en el grupo control y en las dietas experimentales favorecieron la buena respuesta de los peces, logrando reaccionar adecuadamente a los modificadores biológicos como los β -glucanos (1,3 / 1,6).

Durante la cuarta semana se observaron incrementos estadísticos significativos ($p < 0.05$) en el conteo de células fagocíticas sanguíneas reactivas al nitroazul de tetrazolio (FCB/NBT); estas células son capaces de ingerir a las bacterias matándolas a través de un proceso denominado explosión respiratoria, generando anión superóxido (O_2^-) que deriva en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y en algunos radicales hidroxilos (OH) libres. Yildirim *et al.*, (2003), al evaluar la respuesta inmune del bagre de canal (*I. punctatus*) mostrada a dietas con distintos niveles de un polisacárido, el gosipol, obtenido de la planta de algodón, no observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre dietas tratadas y la dieta control; sin embargo, hacen mención de una amplia variabilidad en los datos individuales de cada pez, lo que puede ocasionar la falta de significancia estadística. La dieta que mayores conteos fagocíticos celulares tuvo en este experimento fue la concentrada al 0.5%, seguida por la de 0.05% sin observarse diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre ellas, lo que indica que no existe necesidad de incrementar tanto la concentración de β -glucanos (1,3 / 1,6) para obtener una respuesta biológica al compuesto.

La actividad inmunoestimulante de los β -glucanos puede variar dependiendo de la fuente de los mismos, del tiempo de administración y de la especie a la que se administran (Jaafar *et al.*, 2011); en el presente estudio se observó un índice fagocítico superior en la dieta concentrada al 0.05% con β -glucanos (1,3 / 1,6), manteniéndose por encima del resto de los grupos desde la semana 3 hasta concluir el experimento en la quinta semana; sin embargo, la amplia variabilidad de los datos individuales no permite acentuar alguna diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre ellos; en este sentido, Zhu *et al.*, (2012) utilizando un compuesto de polisacáridos obtenido de *S. cerevisiae* formado por al menos 25% de β -glucanos (1,3 / 1,6) como complemento a la dieta del

bagre de canal (*I. punctatus*) a una concentración del 0.3%, obtuvieron resultados significativos ($p < 0.05$) en la mejora del sistema inmune a través del incremento en la actividad fagocítica.

Los agentes modificadores de la respuesta inmune como los β -glucanos (1,3 / 1,6) tienen la propiedad de inmunoestimar ampliamente a los organismos tanto en el sistema inmune específico como en el no específico (Barandica and Tort, 2008); el riñón anterior y el bazo son órganos linfoides involucrados en la respuesta inmune que se encargan, entre otras funciones, de la producción de anticuerpos en el organismo (Manning, 1994) que puede ser medible indirectamente a través de la relación del peso del órgano con respecto al peso del pez obteniendo los índices bazo y nefro-somáticos. Comparando los diferentes resultados obtenidos en este estudio se observaron diferencias marcadas en el índice bazo-somático (SSI) durante las semanas 2 y 4 con respecto al resto de las semanas; sin embargo, en esta última semana el grupo control obtuvo un promedio mayor en sus valores seguida por la dieta que utilizó β -glucanos (1,3 / 1,6) al 0.05%; en particular, es durante la semana 2 donde se observa un mayor índice de esta misma dieta con respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte, el número de observaciones de tejido fagocítico reactivo al NBT en bazo mostró superioridad en la dieta de β -glucanos (1,3 / 1,6) al 0.05% durante las semanas 3 y 4 con respecto al resto de los grupos. Los hallazgos antes mencionados concuerdan con lo reportado por Rohlenová *et al.*, (2011) quienes indican que existe una asociación entre la actividad fagocítica medida con pruebas de reactividad al NBT y el incremento en el SSI en estudios realizados en carpas (*Cyprinus carpio*); esto es debido a la proliferación de linfocitos B en el bazo, que al ser estimulado inmunológicamente incrementa su actividad y su tamaño, y que en contraste, al ser inmunosuprimido lo reduce (Harford *et al.*, 2006). Con respecto a los tiempos semanales donde se muestra un incremento en los parámetros inmunológicos antes mencionados, puede observarse que no existe una similitud entre ellos siendo diferente a lo reportado por el National Research Council (1992) quienes categorizan al SSI como un índice relevante en la inmunocompetencia; estas contradicciones, han sido reportadas anteriormente en estudios donde se no se

encuentra una relación entre el tamaño del bazo (índice bazo-somático) y el estado inmunológico del animal (Poisot *et al.*, 2009).

Al suponer que al incrementar la cantidad de β -glucanos (1,3 / 1,6) administrada a la dieta comercial se elevará en la misma proporción la respuesta inmune deseada en el organismo, se debe tomar en cuenta que para cada especie de pez es necesario establecer las concentraciones o dosis inmunoestimulantes adecuada de β -glucanos (1,3 / 1,6) que lleve a mejorar los parámetros inmunológicos en el organismo; de no llevarlo a cabo, se pueden ocasionar efectos contrarios al deseado al momento de que los organismos tengan contacto con agentes patógenos y su cuerpo deba generar una defensa inicial contra ellos; con respecto a esto, Robertsen *et al.*, (1990) reportan que altas concentraciones de β -glucanos (1800 $\mu\text{g/pez}$) obtenidos de *S. cerevisiae* en salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.) incrementaron los índices de mortalidad al ser desafiados con *Vibrio anguillarum* una semana después de la administración del producto; por el contrario, en este bioensayo no se presentó mortalidad alguna a pesar de que el tratamiento tuvo una duración de cinco semanas.

Este estudio demostró que la suplementación de la dieta del bagre de canal (*I. punctatus*) con hasta un 0.5% de β -glucanos (1,3 / 1,6) es seguro para esta especie; así mismo, se puede observar que una concentración del 0.05% de β -glucanos (1,3 / 1,6) en la dieta resulta suficiente para estimular al sistema inmune no específico del bagre de canal (*I. punctatus*) en parámetros como el conteo de células blancas y en la actividad de células fagocíticas, por lo que no es necesario utilizar 10 veces más en emplear una concentración tan alta en la dieta, reduciendo así los costos en una posible utilización dentro de la industria piscícola, siendo necesaria su evaluación frente a agentes patógenos importantes para los acuicultores, tal como lo es el monogeneo *L. floridanus*.

7.5.2. Evaluar el efecto del ácido ascórbico en la inmunoestimulación de juveniles de bagre de canal al ser adicionados a una dieta comercial del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*.

El ácido ascórbico (vitamina C), al igual que los β -glucanos (1,3 / 1,6), es un compuesto que tiene la capacidad de modificar la respuesta biológica de los organismos (Bohn and BeMiller, 1995); además de que es esencial para el óptimo crecimiento del bagre de canal (*I. punctatus*) e influye en procesos hematológico e inmunológicos del organismo (Corredor and Landines, 2009) protegiéndolo incluso contra radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo (Farahi et al., 2011; Bae *et al.*, 2012); este compuesto ha generado mucho interés en cuanto a la función inmune que puede inducir y la resistencia a patógenos que brinda a los organismos al ser utilizada en dosis superiores a la esencial para cada especie.

Kumari and Sahoo (2005) evaluaron la respuesta inmune no específica en dietas de ácido ascórbico suplementadas en el bagre asiático (*Clarias batrachus*) demostrando que una dosis de 500 mg/kg de alimento, administrado durante 4 semanas son suficientes para obtener una inmunoestimulación no específica; por el contrario, los resultados obtenidos en este estudio muestran que en el bagre de canal (*I. punctatus*) fueron necesarios 750 mg/kg para incrementar una respuesta inmune no específica, tal como lo es en el conteo leucocitario y las células reactivas al nitroazul de tetrazolio. Estos parámetros proporcionan una idea del estado inmune en que se encuentra el organismo (Tewary and Patra, 2011); la diferencia en la cantidad de ácido ascórbico que mejora los parámetros inmunológicos quizá se deba a que los requerimientos de vitamina C propios para cada especie no son iguales y que ninguna de ellas es capaz de sintetizarla *de novo* por lo que debe ingerirla a través de la dieta (Corredor and Landines, 2009). No está determinado con exactitud el papel que tiene la vitamina C en los parámetros antes mencionados; sin embargo, altas concentraciones superiores a las requeridas esencialmente para el óptimo desarrollo del organismo brindan bondades al sistema inmune de los peces (Martins, 1998), esto probablemente debido a que la vitamina C es especialmente requerida para el funcionamiento de los fagocitos sanguíneos (monocitos)

pudiendo encontrarse en ellos concentraciones de vitamina C superiores hasta en 80 veces a las que están presentes en el plasma (Levy, 2001); por otra parte, debe recalcar que ambos estudios coinciden en cuanto al tiempo necesario para una mejora inmunológica ocurriendo esta entre la tercera y la quinta semana de tratamiento; dando con esto suficiente tiempo a que las concentraciones de vitamina C sean estables en todas las células del organismo (Kumari and Sahoo, 2005); dos de los parámetros que a su vez se notaron incrementados significativamente ($p < 0.05$) al finalizar la tercera semana fueron el conteo de células fagocíticas sanguíneas reactivas al nitroazul de tetrazolio (FCB/NBT) y el índice fagocítico; resultados similares han sido reportados mostrando los efectos positivos de la vitamina C (ácido ascórbico) en la actividad de los macrófagos sanguíneos (Verlhac et al., 1993; Mulero *et al.*, 1998); estas células son capaces de ingerir a las bacterias matándolas a través de un proceso llamado explosión respiratoria, el cual fue discutido en el apartado anterior.

En este experimento se mostraron valores superiores en el hematocrito, hemoglobina y conteo de células rojas de los peces durante la primer semana de tratamiento; en especial en el grupo control y en el grupo que utilizó menores concentraciones de ácido ascórbico; estos resultados son similares a los reportados por Sandnes *et al.*, (1990) quienes evaluaron el uso de hasta 5000 mg/kg de ácido ascórbico en dietas para salmón del Atlántico (*Salmo salar*) que aunque son especies que se desarrollan a muy diferentes temperaturas, tienen similitud en el papel que tiene la vitamina C con relación a propiedades hematológicas. Con respecto a lo anterior, el hematocrito se puede mantener mas alto en la suplementación con dosis menores de vitamina C debido a que ésta influye directamente en el metabolismo del hierro (Fe) en los peces, presente en los eritrocitos (Hilton, 1989); por lo tanto, a dosis mayores de vitamina C (ácido ascórbico) se tendrá una mayor absorción del hierro por el organismo ya que incrementa su absorción en el intestino y al no complementarse adicionalmente en la dieta, ocasiona una disminución en los parámetros hematológicos como el hematocrito y hemoglobina, siendo recomendable suplementar hierro a la dieta en proporción al incremento de vitamina C (Lim *et al.*, 2000). Se ha documentado que este decremento en los parámetros hematológicos no interfieren en la respuesta del

sistema inmune a altas concentraciones de vitamina C y por el contrario, la resistencia a estrés y a patógenos se incrementa sin la suplementación de hierro (Sandnes et al., 1990; Martins, 1998; Lim *et al.*, 2000, Rahfiludin and Ginandjar, 2013).

La glucosa mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) únicamente en el análisis semanal y de la misma manera como se discutió en el apartado anterior de β -glucanos (1,3 / 1,6), explicando la relación directa entre los altos niveles de estrés y los altos niveles de presentes de la glucosa en sangre (Barandica and Tort, 2008); en este estudio no se presentaron diferencias entre las distintas dietas de ácido ascórbico (250, 500 y 750 mg/kg) con respecto al grupo control, colocándolos en igualdad de condiciones semana tras semana, sin interferir en la respuesta inmune provista por el ácido ascórbico, lo cual es similar a lo hallado por Evans (2003); por otra parte, Galindo-Villegas and Hosokawa (2004) señalan que un incremento en los niveles de cortisol en el organismo agotará el ácido ascórbico disponible, ya que afecta significativamente en su proceso metabólico, afectando así la respuesta inmune no específica del organismo.

El riñón anterior es un órgano linfoide-hematopoyético que ha sido ampliamente estudiado en relación a la actividad inmune inespecífica proporcionada a los peces por diversos compuestos como el ácido ascórbico (vitamina C) (Sandnes et al., 1990; Lim *et al.*, 2000; Sealey and Gatlin, 2002), y de la misma manera que sucedió en la suplementación con β -glucanos (1,3 / 1,6), el índice bazo y nefro-somático (SSI, NSI) tuvieron una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) semanal únicamente, siendo la cuarta semana la que presentó valores superiores; estas hallazgos son similares a los reportados por Rohlenová *et al.*, (2011) al utilizar β -glucanos (1,3 / 1,6); sin embargo, en el caso del ácido ascórbico, los grupos con dietas de tratamiento (250, 500, 750 mg/kg) mostraron valores inferiores al grupo control; esto va de acuerdo con lo señalado por Poisot *et al.*, (2009) mencionado en el apartado anterior, quienes no encontraron una relación entre el estado inmunológico y el tamaño del riñón anterior y el bazo (NSI, SSI). En este sentido, Ishikawa *et al.*, (2011) evaluaron la presencia de células fagocíticas en el riñón anterior de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada durante 60 días con altas concentraciones de ácido ascórbico (1000-5000 mg/kg) no

obteniendo diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) comparando contra el grupo control; al respecto, en este estudio se observó una mayor cantidad de tejido de impronta de riñón anterior reactiva al nitroazul de tetrazolio en los peces suplementados con la dieta de 750 mg/kg en la cuarta semana de tratamiento, sugiriendo una inmunoestimulación en el bagre de canal pudiendo deberse estos resultados quizá a que el hecho de que las células fagocíticas posean una gran concentración de ácido ascórbico comparada con la vitamina circulante en plasma; ello no significa que necesariamente se produzcan mayor cantidad de éstas células o linfocitos por el organismo o que el órgano incremente su tamaño, siendo esta una controversia que en la actualidad se sigue discutiendo.

La importancia de lo anterior puede deberse a las posibles interacciones entre la resistencia al estrés y la reducción del estrés oxidativo (Corredor and Landines, 2009; Farahi *et al.*, 2011; Özkan *et al.*, 2012), o incluso el incremento a la resistencia a enfermedades o a infecciones parasitarias y a la inmunoestimulación inespecífica proporcionada a los peces con la ingesta de altos niveles de ácido ascórbico (Waagbø *et al.*, 1993; Martins, 1998; Cuesta *et al.*, 2002; Kumari and Sahoo, 2005).

Esta investigación sugiere que los altos niveles de ácido ascórbico o vitamina C afectan significativamente la actividad inmunológica inespecífica del bagre de canal (*I. punctatus*) en el conteo leucocitario y en las células fagocíticas presentes en sangre y en riñón anterior, esto probablemente debido a la alta demanda de sustancias antioxidantes necesarias en la prevención del estrés oxidativo inducido por los radicales libres en el intento de contrarrestar infecciones (Wahli *et al.*, 1998).

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se reportan por primera vez los tiempos de sobrevivencia *in vitro* del monogeneo *Ligictaluridus floridanus* inmerso en soluciones de praziquantel (2, 5 y 10 mg/L), metrifonato (0.25, 0.5 y 0.75 mg/L) y peróxido de hidrógeno (150, 300 y 570 mg/L), concluyendo con efectos antiparasitarios de los tres compuestos a dosis de 10 mg/L de praziquantel; 0.5 y 0.75 mg/L de metrifonato y 300 y 570 mg/L de peróxido de hidrógeno, utilizando diferentes diluyentes (solución salina (0.65 %), agua destilada y agua de acuario); tomando estos resultados como base para los bioensayos *in vivo*.

Se determinó que el efecto de los antiparasitarios antes mencionados es influenciado por el diluyente o medio en que se aplica el tratamiento, concluyendo que los estudios *in vitro* preliminares deben ser lo más apegados a las condiciones naturales en la medida de lo posible para garantizar la obtención de resultados similares en la práctica.

En cuanto a los estudios antiparasitarios realizados *in vivo* con praziquantel, metrifonato y peróxido de hidrógeno se concluye que únicamente los dos primeros funcionaron como agentes de control en el número de parásitos (*L. floridanus*) presentes en las branquias del bagre de canal (*I. punctatus*) administrados en dosis de 10 y 0.5 mg/L respectivamente, mientras que el peróxido de hidrógeno a razón de 570 mg/L actúa como un agente 100 % efectivo contra el trematodo monogeneo *Ligictaluridus floridanus*; sin embargo, estas dosis tan altas podrían ocasionar daño en el tejido branquial; futuras investigaciones son necesarias para establecer posibles efectos en el tejido branquial del bagre de canal (*I. punctatus*) en dosis de 300 a 570 mg/L, ya que estas dos dosis únicamente mostraron diferencias en el tiempo de sobrevivencia parasitaria al utilizar agua destilada como diluyente, siendo iguales estadísticamente en el uso de solución salina y agua de acuario como diluyentes *in vitro*.

Este estudio determinó por primera ocasión la mejora en el sistema inmune no específico del bagre de canal (*I. punctatus*) al utilizar un derivado purificado de β -glucanos (1,3 / 1,6) aislado de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y mezclado a un

alimento comercial; estos resultados sugieren que una concentración de 0.05 % de β -glucanos (1,3 / 1,6) es suficiente para lograr una mejora en el sistema inmune no específico de bagre de canal (*I. punctatus*); del mismo modo se observó con una suplementación de 750 mg/kg de ácido ascórbico (vitamina C).

La mejora en el sistema inmune no específico de los organismos está relacionada con la resistencia a estrés, estrés oxidativo e infecciones (bacterianas, parasitarias y víricas); además de esto, el abuso en la utilización de agentes químicos para el control de las infecciones parasitarias puede ocasionar el fenómeno de daño al ambiente; es por eso que el uso de agentes modificadores de la respuesta biológica de los organismos como los β -glucanos (1,3 / 1,6) y el ácido ascórbico (vitamina C) son propuestos para evitar infecciones severas y reducir la cantidad de parásitos monogeneos (*L. floridanus*) en las explotaciones piscícolas.

Los resultados obtenidos de la adición de β -glucanos (1,3 / 1,6) y ácido ascórbico (vitamina C) en la dieta comercial del bagre de canal (*I. punctatus*) demuestran efectos benéficos en la inmunidad no específica de los peces en diversos parámetros entre la tercera y quinta semana de tratamiento; esta similitud cronológica plantea la necesidad de futuras investigaciones empleando los dos productos de manera simultánea, con el fin de evaluar su posible efecto sinérgico, potencializando sus efectos en el bagre de canal y así usarlo en investigaciones del bagre de canal (*I. punctatus*).

LITERATURA CITADA

Akramienė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E. 2007. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43:597-606.

Alaverdi N, Sehy D, Lee S. 2007. Cytokines - Master regulators of the immune system. © 2007 eBioscience.

Albalat A, Liarte C, MacKenzie S, Tort L, Planas JV, Navarro I. 2005. Control of adipose tissue lipid metabolism by tumor necrosis factor- α in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology* 184:527-534.

Alvarez-Pellitero P. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126:171-198.

Andrews JW, Murai T. 1975. Studies on the vitamin c requirements of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *The journal of Nutrition* 105:557-561.

Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H, Hirono I. 2008. Molecular innate immunity in teleost fish: Review and future perspectives. *Fisheries for global welfare and environment*, 5th world fisheries congress 2008 pp. 263-276. TERRAPUB 2008.

Auro-de-Ocampo A, Ocampo-Camberos L. 1999. Diagnóstico del estrés en peces. *Veterinaria México* 30:337-344.

Bae JY, Park GH, Yoo KY, Lee JY, Kim DJ, Bai SC. 2012. Re-evaluation of the optimum dietary vitamin c requirement in juvenile eel, *Anguilla japonica* by using L-ascorbyl-2-monophosphate. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 25:98-103.

Baer DM, Krause RB. 1968. Spurious laboratory values resulting from simulated mailing conditions. A study of time and temperature variables. *Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists*, 38:137.

Bai SC, Gatlin III DM. 1992. Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 10:183-188.

Barandica I, Tort L. 2008. Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 32:267-284.

Barros MM, Lim C, Evans JJ, Klesius PH. 2000. Effect of iron supplementation to cottonseed meal diets on the growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Applied Aquaculture* 10:65-86.

Barton BA, Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases 1:3-26.

Bohn JA, BeMiller JN. 1995. (1-3)-Beta-d-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. Carbohydrate Polymers 28:3-14.

Boltaña S, Reyes-Lopez F, Morera D, Goetz F, MacKenzie SA. 2011. Divergent responses to peptidoglycans derived from different *E. coli* serotypes influence inflammatory outcome in trout, *Oncorhynchus mykiss*, macrophages. BMC Genomics 12:1-13.

Bonaldo A, Thompson KD, Manfrin A, Adams A, Murano H, Mordenti AL, otros. 2009. The influence of dietary β -glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis. Italian Journal of Animal Science 6:151-164.

Bowker JD, Carty D, Dotson MM. 2012. Efficacy of 35% PEROX-AID (hydrogen peroxide) in reducing an infestation of *Gyrodactylus salmonis* in freshwater-reared Rainbow Trout. North American Journal of Aquaculture 74:154-159.

Breazile JE, Zinn LL, Yauk JC, Mass HJ, Wollscheid J. 1982. A study of haematological profiles of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Biology 21:305-309.

Buchmann K. 1988a. Epidemiology of pseudodactylogyrosis in an intensive eel-culture system. Diseases of Aquatic Organisms 5:81-85.

Buchmann K. 1988b. Temperature-dependent reproduction and survival of *Pseudodactylogyrus bini* (Monogenea) on the European eel (*Anguilla anguilla*). Parasitology Research 75:162-164.

Buchmann K. 1993. Screening of 22 Anthelmintics for their efficacy against the gill-parasitizing monogeneans pseudo-dactylogyrus spp. from the european eel (*Anguilla anguilla*). Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology 1:11- 19.

Buchmann K. 1999. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans - a model. Folia Parasitologica 46:1-9.

Buchmann K, Kania PW, Neumann L, De'Besi G. 2011. Pseudodactylogyrosis in *Anguilla anguilla* (Actinopterygii: Anguilliformes: Anguillidae): change of control strategies due to occurrence of anthelmintic resistance. Acta Ichthyologica et Piscatoria 41:105-108.

Busch S, Dalsgaard I, Buchmann K. 2003. Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host. *Veterinary Parasitology* 117:117-122.

Caipang CM, Lazado CC, Berg I, Brinchmann MF, Kiron V. 2011. Influence of alginic acid and fucoidan on the immune responses of head kidney leukocytes in cod. *Fish Physiology Biochemistry* 37:603–612.

Castro R, Zou J, Secombes CJ, Martin SA. 2011. Cortisol modulates the induction of inflammatory gene expression in a rainbow trout macrophage cell line. *Fish and Shellfish Immunology* 30:215-223.

Chang J, Zhang W, Mai K, Hongming M, Wei X. 2010. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus Selenka*) challenged with *Vibrio splendidus*. (Q. Yantao, Ed.) *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)* 9:389-394.

Chen SC, Thompson KD, Adams A, Richards RH. 2001. The production of a lymphokine (macrophage activating factor) by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), leucocytes stimulated with the extracellular products of *Mycobacterium sp.* *Journal of Fish Diseases* 24:217-223.

Chisholm LA, Whittington ID. 2002. Efficacy of praziquantel bath treatments for monogenean infections of the *Rhinobatos typus*. *Journal of Aquatic Animal Health* 14:230-234.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). 2008. Anuario estadístico de Acuacultura y Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México Disponible en el sitio de red: www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/.

Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Tamaulipas A. C. (CESATAM). 2009. Programa de Sanidad Acuícola de Tamaulipas. Recuperado en Marzo de 2012, de <http://www.cesatam.com/>

Corredor AS, Landines MA. 2009. Efecto del ácido ascórbico sobre la respuesta de los peces ante condiciones de estrés. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia* 56:53-66.

Cruz-Lacierda ER, Pineda AJT, Nagasawa K. 2012. *In vivo* treatment of the gill monogenean *Pseudorhabdosynochus lantauensis* (Monogenea, Diplectanidae) on orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) cultured in the Philippines. *International Journal of the Bioflux Society* 5:330-336.

Cuesta A, Ortuño J, Rodríguez A, Esteban MA, Meseguer J. 2002. Aplicación de sustancias naturales (vitaminas y quitina) para modular la capacidad de respuesta a infecciones víricas o protozoarias y frente a tumores de doradas *Sparus auratus* L., 1758 cultivadas. Boletín del Instituto Español de Oceanografía, 18:183-187.

Del Rio-Zaragoza OB, Fajer-Ávila EJ, Almazán-Rueda P. 2011. Influence of β -glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans. Parasite Immunology 33:483–494.

Dotta G, Pedreira-Mouriño JL, Jatobá A, Burgos-Morán RE, Pilati C, Laterça-Martins M. 2011. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. Maringá, Acta Scientiarum. Biological Sciences 33.

Durborow RM. 2000. Catfish Farming in Kentucky. Frankfort, Kentucky, U.S.A. Kentucky State University.

El Naggar GO, Lovell RT. 1991. L-Ascorbyl-2-Monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-Ascorbic acid but L-Ascorbyl-2-Sulfate is inferior to L-Ascorbic acid for channel catfish. Journal of Nutrition 121:1622-1626.

El-Gohary MS, Mohamed SG, Khalil RH, El-Banna S, Soliman MK. 2005. Immunosuppressive effects of metrifonate on *Oreochromis niloticus*. Egyptian Journal of Aquatic Research 31:448-458.

Ellis AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative immunology 25:827-839.

Emadi H, Amaninejad P, Emtiazjoo M, Hosseinzadeh-Sahhafi H. 2010. Effects of *Dunaliella* microalgae (*Dunaliella salina*) on different levels of complement C3, C4 and antioxidant capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Advances in Environmental Biology 4:456-463.

Esteban AM, Meseguer J, Cuesta A. 2012. Fighting Virus and Parasites with Fish Cytotoxic Cells. (E. Carvalho, Ed.) ISBN: 978-953-51-0497-1, Health and Environment in Aquaculture. InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/fighting-virus-and-parasites-with-fish-cytotoxic-cells>

Evans JJ. 2003. Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Aquatic Animal Health 15:202-208.

Evenhuis J, Bengtén E, Snell C, Quiniou SM, Miller NW, Wilson M. 2007. Characterization of additional novel immune type receptors in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Immunogenetics 59:661–671.

Farahi A, Kasiri M, Sudagar M, Talebi A. 2011. The effect of ascorbic acid on hatching performance and tolerance against environmental stressor (high temperature) by immersion of angel fish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823) fertilized eggs. World Journal of Fish and Marine Sciences 3:121-125.

Fierro-Castro MC. 2009. Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura. Tesis de Doctorado, 225 p. Universidad de León, España. <http://hdl.handle.net/10612/800>.

Flores-Quintana C. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. Revista de Ictiología, 10:57-78.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. World Aquaculture 2010. Fisheries and Aquaculture Department, Rome.

Galina J, Yin G, Ardó L, Jeney Z. 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. Fish Physiology Biochemistry 35:669–676.

Galindo-Villegas J, Hosokawa H. 2004. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish. In: Avances en Nutrición Acuicola VII. memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Cruz Suárez IE, Ricque Marie D, Nieto López MG, Villarreal D, Scholz U, González M. (eds.). Hermosillo, Sonora, México, pp. 279-319.

Ganner A, Schatzmayr G. 2012. Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system. Applied Microbiology Biotechnology 95:289–297.

García-Castillo J, Chaves-Pozo E, Olivares P, Pelegrín P, Meseguer J, Mulero V. 2004. The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the *in vivo* proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences 61:1331–1340.

García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. 2002. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor α from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. Immunogenetics 54:200-207.

Goodsell DS. 2006. The molecular perspective: tumor necrosis factor. The Oncologist 11:83-84.

Guo FC, Woo PT. 2009. Selected parasitosis in cultured and wild fish. Veterinary Parasitology 163:207-216.

Hammond-Tooke CA, Nakagawa S, Poulin R. 2012. Parasitism and behavioural syndromes in the fish *Gobiomorphus cotidianus*. Behaviour 149:601–622.

Harford AJ, O'Halloran K, Wright PF. 2006. Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. Fish & Shellfish Immunology, 20:562-573.

Hartwell LH. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* Cell cycle. Bacteriological Reviews 38:164-198.

Heitzman R, Martinez J, Wells R. 2000. Trichlorfon (metrifonate). Residues of some veterinary drugs in animals and foods, Geneva, Rome, 103-114.

Hirazawa N , Ohtaka T, Hata K. 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. Aquaculture 188:1-13.

Hilton JW. 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. Aquaculture 79:223–244.

Hiss S, Sauerwein H. 2003. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 87:2-11.

Hoffman GL. 1985. Worm Parasites (Helmints and Leeches). In: Principal Diseases of Farm Raised Catfish, Plumb JA. (ed.) Auburn, Alabama, pp. 35-49.

Hoffman GL. 1999. Parasites of North American Freshwater Fishes. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press: Ithaca, NY, pp. 539.

Holland JW, Pottinger TG, Secombes CJ. 2002. Recombinant interleukin-1(beta) activates the hypothalamic–pituitary–interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Endocrinology 175:261–267.

Huising MO, Kruiswijk CP, van Schijndel JE, Savelkoul HF, Flik G, Verburg-van Kemenade LB. 2005. Multiple and highly divergent IL-11 genes in teleost fish. Immunogenetics 57:432–443.

Ibiyo LM, Atteh JO, Omotosho JS, Madu CT. 2007. Vitamin C (ascorbic acid) requirements of *Heterobranchus longifilis* fingerlings. African Journal of Biotechnology 6:1559-1567.

Ishikawa T, Mano N, Nakanishi T, Hirose H. 2011. Adverse and beneficial effects of long-term high-concentration ascorbic acid supplementation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 77:1009–1014.

Iwama G, Nakanishi T. 1996. The fish immune system, organism, pathogen and environment (Vol. 15). San Diego, California, U.S.A. Academic Press. 380p

Mohammad RJ, Skov J, Kania PW, Buchmann K. 2011. Dose dependent effects of dietary immunostimulants on rainbow trout immune parameters and susceptibility to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Aquaculture Research and Development* (S3).

Jaafar RM, Skov J, Kania PW, Buchmann K. 2011. Dose dependent effects of dietary immunostimulants on rainbow trout immune parameters and susceptibility to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Aquaculture Research & Development* S3:001. doi:10.4172/2155-9546.S3-001

Jiménez Guzmán F. 2007. Técnicas de diagnóstico presuntivo para enfermedades de peces. Victoria, Tamaulipas.

Kennedy, Stoskopf S. 1993. Immunology. In: *Fish medicine* pp 149-159.

Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274:1-14.

KiHong K, JaeBum C. 2000. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage simulating commercial rockfish *Sebastes schlegeli* culture conditions. *Diseases of Aquatic Organisms* 40:229-231.

Kittilsen S, Schjolden J, Beitnes-Johansen I, Shaw JC, Pottinger TG, Sorensen C, Braastad BO, Bakken M, Overli O. 2009. Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. *Hormones and Behavior* 56:292-298.

Kum C, Sekkin S. 2011. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs. In: *Recent Advances in Fish Farms*. Aral DF. (ed) pp. 169-216.

Kumari J, Sahoo P. 2005. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 280:25–33.

Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA, Guzmán-Méndez BE, López-Madrid W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216:193-201.

Lee JS. 1981. Commercial Catfish Farming (Second Edition ed.). Dunville, Illinois: The Interstate Printers and Publishers Inc. 310 p.

Lee JS. 1995. Producing catfish. Ames, Iowa. recuperado en marzo de 2012 disponible en http://www.aces.edu/dept/fisheries/education/documents/SpeciesModuleCatfish_ABCD.pdf

Levy T. 2001. Optimal Nutrition for Optimal Health. McGraw-Hill Publishing. New York, NY.

Lewbart GL. 1991. Medical management of disorders of freshwater tropical fish. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 13:109-116.

Li Y, Lovell RT. 1985. Elevated Levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. The Journal of Nutrition 115:123-131.

Lim C, Lovell RT. 1978. Pathology of the vitamin C Deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). The Journal of Nutrition 108:1137-1146.

Lim C, Klesius PH, Duncan PL. 1996. Immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* challenge when fed various dietary levels of zinc methionine and zinc sulfate. Journal of Aquatic Animal Health 8:302-307.

Lim C, Klesius PH, Li MH, Robinson EH. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 185:313-327.

Lim C, Shoemaker CA, Klesius PH. 2001. The effect of ascorbic acid on the immune response in fish. In: Ascorbic acid in aquatic organisms; status and perspectives, Dabrowski K (ed.). London, New York, U.S.A. pp. 149-165.

Liu B, Zang XN, Liu XF, Zhang XC, Lei JL. 2012. Stable cell-surface expression of Japanese flounder growth hormone in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and growth-promoting effect on juvenile fish by oral administration. Fish Science 78:99-107.

López-Arrieta J, Schneider L. 2006. Metrifonate for Alzheimer's disease. Cochrane Database of Systematic Reviews. Issue 2. DOI:10.1002/14651858.CD003155.pub3.

Lovell RT. 1973. Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. The Journal of Nutrition 103:134-138.

Lumsden JS, Ostland VE, Ferguson HW. 1998. Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 10:230-240.

Magnadottir B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnology* 12:361–379.

Manning MJ. 1994. Fishes. In: *Immunology, A comparative approach*, Turner RJ (ed). Wiley: New York, pp. 69-100.

Mansell B, Powell MD, Ernst I, Nowak BF. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *Journal of Fish Diseases* 28:253-262.

Margolis L, Esch GW, Holmes JC, Kuris AM, Schad GA. 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology* 68:131-133.

Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova LR, Ramos-Enriquez R. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4:158-178.

Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H. 1997. Target sites of anthelmintics. *Parasitology* 114:111-124.

Martins ML. 1998. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31:655-658.

Martins ML, Myiazaki DM, Tavares-Dias M, Fenerick Jr J, Onaka EM, Bozzo FR, Fujimoto RY, Moraes FR. 2009. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male × *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). *Brazilian Journal of Biology* 69:957-962.

Metwally MA, Fouad IM. 2009. Effects of L-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp. *Global Veterinaria* 3:132-136.

Milla S, Depiereux S, Kestemont P. 2011. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicology* 20:305–319.

Mitchell AJ. 1995. Importance of treatment duration for praziquantel used against larval digenetic trematodes in sunshine bass. *Journal of Aquatic Animal Health* 7:327-330.

Mladineo I. 2005. Parasite communities of adriatic cage-reared fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 64:77-83.

Montelongo-Alfaro IO, Rábago-Castro JL, Sánchez-Martínez JG, Pérez-Castañeda R Vázquez-Sauceda ML. 2012. Determinación de índices parasitarios en una infección experimental de *Ligistalurus floridanus* (Ancyrocephalidae) en bagre de canal, *Ictalurus punctatus* In: Memorias IX Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, Querétaro, Qro., México, Octubre 10-12.

Montero D, Tort L, Robaina L, Vergara JM, Izquierdo MS. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology* 11:473–490.

Morera D, MacKenzie SA. 2011. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response?. *Veterinary Research* 42:1-8.

Mulero V, Esteban MA, Munoz J, Meseguer J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 8: 49-62.

National Research Council. 1992. *Biologic Markers in Immunotoxicology*. Washington, DC: National Academies Press, p. 224.

Natt M, Herrick CA. 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science* 31:735- 738.

Noga EJ. 2000. *Fish disease, diagnosis and treatment* (Second Edition ed.). Iowa State University Press: Ames, Iowa, U.S.A, pp 367.

Nolan DT, Spanings FA, Ruane NM, Hadderingh RH, Jenner HA, Wendelaar-Bonga SE. 2003. Exposure to water from the lower rhine induces a stress response in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45:247–257.

O'Connor CM, Gilmour KM, Arlinghaus R, Van Der Kraak G, Cooke SJ. 2009. Stress and parental care in a wild teleost fish: insights from exogenous supraphysiological cortisol implants. *Physiological and Biochemical Zoology* 82:709-719.

Ogawa K, Inouye K. 1997. Heterobothrium infection of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* – experimental infection. *Fish Pathology* 32:21-27.

Olabuenaga SE. 2000. Fish immune system. *Gayana (Concepc.)* [online] 64:205-215.

Özkan F, Gündüz SG, Berköz M, Hunt AÖ, Yalın S. 2012. The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology Biochemistry* 38:635-643.

Pankhurst NW. 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology* 170:265–275.

Parmar PV, Murthy HS, Tejpal CS, Naveen-Kumar BT. 2012. Effect of brewer's yeast on immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its resistance to white muscle disease. *Aquaculture International* 20:951-964.

Plumb JA, Rogers WA. 1990. Effect of Droncit (praziquantel) on yellow grubs *Clinostomum marginatum* and eye flukes *Diplostomum spathaceum* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 2:204-206.

Poisot T, Šimková A, Hyršl P, Morand S. 2009. Interactions between immunocompetence, somatic condition and parasitism in the chub *Leuciscus cephalus* in early spring. *Journal of Fish Biology* 75:1667-1682.

Rábago-Castro J. 2010. Monitoreo y distribución de enfermedades bacterianas y parasitarias en el cultivo de bagre de canal *Ictalurus punctatus* en Tamaulipas. Monterrey, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.

Rábago-Castro J, Sánchez-Martínez JG, Loredó-Osti J. 2011. Temporal and spatial variations of ectoparasites on cage-reared channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in Tamaulipas, Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society* 42:406-411.

Rábago-Castro JL, Sánchez-Martínez JG, Pérez-Castañeda R, Vázquez-Sauceda ML, Ruiz-Orozco G. 2014. Chronic effects of a monogenean *Ligictaluridus floridanus* (Ancyrocephalidae) infection on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth performance. *Acta Veterinaria Brno* 83:83-87.

Rach JJ, Gaikowski MP, Ramsay RT. 2000. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 12:267-273.

Rahfiludin MZ, Ginandjar P. 2013. The effect of zinc and vitamin C supplementation on hemoglobin and hematocrit levels and immune response in patients with *Plasmodium vivax* malaria. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 44:733.

Ringø E, Olsen RE, Vecino JL, Wadsworth S, Song SK. 2011. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *Journal of Marine Science: Research & Development* 2:1-22.

Robertsen B, Rørstad G, Engstad R, Raa J. 1990. Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Disease* 13:391-400.

Rohlenová K, Morand S, Hyršl P, Tolarová S, Flajšhans M, Šimková A. 2011. Are fish immune systems really affected by parasites? an immunoeological study of common carp (*Cyprinus carpio*). *Parasites and Vectors* 4:1-18.

Ronsón-Paulín JÁ, Medina-Reyna CE. 2002. Probióticos en la acuicultura. *Ciencia y Mar*, 18:45-49.

Rubio-Godoy M. 2007. Fish host-monogenean parasite interactions, with special reference to Polyopisthocotylea. In: *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases* (1° ed) Terrazas LI, Research Singpost. Kerala, India pp. 91-109.

Rubio-Godoy M. 2010. Inmunología de los peces óseos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1:43-57.

Sandnes K, Hansen T, Killie J-EA, Waagbø R. 1990. Ascorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for atlantic salmon (*Salmo salar*): 1. Growth, bioactivity, haematology and humoral immune response. *Fish Physiology and Biochemistry* 8:419-427.

Santacroce MP, Merra E, Centoducati G, Zacchino V, Casalino E. 2012. Effects of dietary yeast *Saccaromyces cerevisiae* on the antioxidant system in the liver of juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38:1497-1505.

Schelkle B, Doetjes R, Cable J. 2011. The salt myth revealed: treatment of gyrodactylid infections on ornamental guppies, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture*. 311:74-79.

Schelkle B, Shinn AP, Peeler E, Cable J. 2009. Treatment of gyrodactylid infections in fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86:65-75.

Schreck CB. 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165:549–556.

Schmahl G, Taraschewski H. 1987. Treatment of fish parasites. 2. Effects of praziquantel, niclosamide, levamisole-HCl, and metrifonate on monogenea (*Gyrodactylus aculeati*, *Diplozoon paradoxum*). Parasitology Research 73:341-351.

Scholz T. 1999. Parasites in cultured and feral fish. Veterinary Parasitology 84:317-335.

Scot P. 1993. Therapy in Aquaculture. In: Aquaculture for veterinarians. Brown L. (ed) Oxford: Pergamon Press. pp 91-129.

Sealey WM, Gatlin III DM. 2002. Dietary vitamin c and vitamin e interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. The Journal of Nutrition 132:748-755.

Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, Cunningham C, Zou J. 2001. Cytokines and innate immunity of fish. Developmental and Comparative Immunology 25:713-723.

Sharp N, Diggles B, Poortenaar C, Willis T. 2004. Efficacy of Aqui-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriole*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. Aquaculture 236:67-83.

Shoemaker CA, Klesius PH, Lim C, Yildirim M. 2003. Feed deprivation of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), influences organosomatic indices, chemical composition and susceptibility to *Flavobacterium columnare*. Journal of Fish Diseases 26:553-561.

Silveira-Coffigny R. 2006. Los productos fito-farmacéuticos en la acuicultura (The phyto-pharmaceuticals products in aquaculture). REDVET. 7:1-10.

Sitjà-Bobadilla A, Conde de Felipe M, Alvarez-Pellitero P. 2006. *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture 261:856-864.

Soares MC, Oliveira RF, Ros AF, Grutter AS, Bshary R. 2011. Tactile stimulation lowers stress in fish. Nature Communication 2:1-5.

Stephens FJ, Cleary JJ, Jenkins G, Jones JB, Raidal SR, Thomas JB. 2003. Treatments to control *Haliotrema abaddon* in the West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum*. Aquaculture 215:1-10.

Stoskopf MK. 1993. Clinical Pathology. In: Fish Medicine (First Edition ed.). Saunders.

Tewary A, Patra BC. 2011. Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research and Development 2:1-7.

Thomassen JM. 2006. Hydrogen peroxide as a delousing agent for Atlantic salmon. In: Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice. Boxshall GA, Defaye D. (eds.) Chichester: Ellis Horwood Limited. pp. 290-295.

Thoney DA, Hargis Jr, WJ. 1991. Monogenea (platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. Annual Review of Fish Diseases 1:133-153.

Toa DG, Alfonso LO, Iwama GK. 2004. Stress response of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to chemical cues released from stressed conspecifics. Fish Physiology and Biochemistry 30:103–108.

Tojo JL, Santamarina MT. 1998. Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* II: *Gyrodactylus* sp. Diseases of Aquatic Organisms 33:187-193.

Tort L, Balasch JC, Mackenzie S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Inmunología 22:277-286.

Tovar-Ramírez D, Reyes-Becerril MC, Guzmán-Villanueva L, Gleaves-López V, Civera-Cerecedo R, Ascencio-Valle F, García-López V, Barbosa-Solomieu V, Gisbert-Casas E, Andree KB, Alvarez-González CA, Moyano-López FJ, Ortiz-Galindo JL, Hinojosa-Baltazar P, Gutierrez-Rivera JN, Millán-Martínez AA, Linarez-Aranda M. 2008. Probióticos en Acuicultura: Avances Recientes del Uso de Levaduras en Peces Marinos. 237- 257 pp. In: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Zalazar M., Nieto López DA, Villarreal Cavazos JPL, Viana MT (eds). Avances en Nutrición Acuicola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. Noviembre 24-27.

Uribe C, Folch H, Enriquez R, Morgan G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina 56:486–503.

USFDA (United States Food and Drug Administration). 2015. *Approved Animal Drug Products (Green Book)*, [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/UCM042860.pdf> [Revisado el 13 de agosto de 2015].

Van der Salm AL, Nolan DT, Wendelaar-Bonga SE. 2002. *In vitro* evidence that cortisol directly modulates stress-related responses in the skin epidermis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Fish Physiology and Biochemistry 27:9-18.

Verlhac V, N'Doye A, Gabaudan J, Troutaud D, Deschaux P. 1993. Vitamin nutrition and fish immunity; influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Fish nutrition in practice, INRA (ed), pp 167-177.

Villamil L, Figueras A, Novoa B. 2003. Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish & Shellfish Immunology 14:157-169.

Waagbø R, Glette J, Raa-Nilsen E, Sandnes K. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiology and Biochemistry 12:61-73.

Wahli T, Verlhac V, Gabuadan J, Meire W, Schuep W. 1998 Influences of combined vitamin C and E on immunity and disease resistance of rain bow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Disease 21:127-137.

Welker TL, Lim C, Yildirim-Aksoy M, Shelby R, Klesius PH. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. Journal of the World Aquaculture Society 38:24-35.

Wendover N. 2009. Manejo de la salud de la tilapia en sistemas complejos. In: Intervet Schering-Plough Animal Health (eds). Memorias simposium manejo de *Streptococcus* en peces de aguas cálidas. Congreso mundial de Acuicultura 2009, Veracruz, México Septiembre 25.

Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA. 2001. Effect of lectins on the invasion of *Ichthyophthirius theront* to channel catfish tissue. Diseases of Aquatic Organisms 45:115-120.

Yildirim M, Lim C, Wan PJ, Klesius PH. 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid. Aquaculture 219:751-768.

Yonar ME, Yonar SM, Silici S. 2011. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). Fish and Shellfish Immunology 31:318-325.

Zhao H-X, Cao J-M, Wang A-L, Du Z-Y, Ye C-X, Huang Y-H, otros. 2012. Effect of long-term administration of dietary β -1,3-glucan on growth, physiological, and

immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquacult International 20:145–158.

Zhu H, Liu H, Yan J, Wang R, Liu L. 2012. Effect of yeast polysaccharide on some hematologic parameter and gut morphology in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Fish Physiology and Biochemistry, 38:1441-1447.

APÉNDICES

APÉNDICE A. Solución de Natt y Herrick

El método de Natt y Herrick es un método directo de recuento de eritrocitos y leucocitos para aves, reptiles y peces. La misma dilución es utilizada tanto para glóbulos rojos como blancos; el total de ambas células se puede obtener simultáneamente desde la misma carga en la cámara de Neubauer (Natt y Herrick 1952).

Para preparar la solución se deben añadir las soluciones en el siguiente orden:

- 3.88 g de $\text{Na}_2\text{Cl}^{-2}$, 50g Na_2SO_4
- 2.17 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 7.5 mL 37% de Formol
- 0.10 g de Violeta de Metilo 2B (Sigma M4511)
- Disolver en agua destilada, aforar a un volumen de 1000 mL
- Volumen final: 1000 mL a pH 7.3
- Dejar una noche y filtrar con el filtro de Whatman n°2

APÉNDICE B. Hoja de Identidad *S. aureus* (ATCC 25923)

COMISION FEDERAL PARA LA PROTECCION CONTRA RIESGOS SANITARIOS

GERENCIA DE ANALISIS Y DESARROLLO DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS



HOJA DE IDENTIDAD

Staphylococcus aureus

Subcultivo de una cepa clasificada por American Type Culture Collection
ATCC 25923

Donada a: LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA DE TAMAULIPAS
el día 9 de Abril de 2010.

La cepa cumple con los parámetros de viabilidad y pureza

MEDIO DE CULTIVO DE MANTENIMIENTO Agar Base Sangre

TEMPERATURA DE INCUBACION 35 °C +/- 2 °C

IDENTIFICACION BIOQUÍMICA

-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR

O Testigo negativo; GLU D-glucosa; FRU D-fructosa; MNE D-manosa; MAL D-maltosa; LAC D-lactosa; TRE D-trehalosa; MAN D-manitol; XLT xilitol; MEL D-melibiosa; NIT nitrato de potasio; PAL β-nafti-fosfato; VP piruvato de sodio; RAF D-rafinosa; XYL D-xilosa; SAC D-sacarosa; MDG methyl- alfaD-glucopiranosisa; NAG N-acetil-glucosamina; ADH L-arginina; URE urea

PRUEBA DE COAGULASA: POSITIVA

PRUEBA DE TERMONUCLEASA : POSITIVA

USOS: CEPA RECOMENDADA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO EN ALIMENTOS.

**SUFRAGIO EFECTIVO NO REELECCIÓN
DIRECTOR EJECUTIVO DE CONTROL ANALÍTICO**

IBI. RAÚL YANKO MONTAÑO CHÁVEZ

RYMCH/CPER

APÉNDICE C. Método turbidimétrico de McFarland

Los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario (Cl_2Ba) al 1% con ácido sulfúrico (SO_4H_2) al 1% en volúmenes específicos.

Tabla 8

Escala de McFarland. Concentraciones para establecer la turbidimetría y su equivalencia en UFC bacterianas.

Tubo	Cl_2Ba (1%)	SO_4H_2 (1%)	UFC/ml
1	0.1 ml	9.9 ml	3.0×10^8
2	0.2 ml	9.8 ml	6.0×10^8
3	0.3 ml	9.7 ml	9.0×10^8
4	0.4 ml	9.6 ml	1.2×10^9
5	0.5 ml	9.5 ml	1.5×10^9
6	0.6 ml	9.4 ml	1.8×10^9
7	0.7 ml	9.3 ml	2.1×10^9
8	0.8 ml	9.2 ml	2.4×10^9
9	0.9 ml	9.1 ml	2.7×10^9
10	1.0 ml	9.0 ml	3.0×10^9

APÉNDICE D. Solución amortiguadora con fosfatos (PBS)

A. Solución de Sorensen

Fosfato disódico anhídrido (Na_2HPO_4)	8.33 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1.09 g
Agua destilada	1000 mL

B. Solución salina

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 mL

C. Solución final

Solución de Sorensen	40 mL
Solución salina	460 mL
Ajustar el pH a 7.2	

RESUMEN BIOGRÁFICO

Flaviano Benavides González

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: INFLUENCIA DE B-GLUCANOS Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA RESPUESTA INMUNE DEL BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*) (RAFINESQUE, 1818) EN INFECCIONES CON *Ligictaluridus floridanus* (MUELLER, 1936) (ANCYROCEPHALIDAE)

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacido en Cd. Victoria, Tamaulipas el 9 de Diciembre de 1985, hijo de Héctor Benavides Aguilar y Elvira María González Montilla.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en 2009 con mención honorífica, segundo lugar en la generación. Maestro en Ciencias Veterinarias y Zootécnicas por la Universidad Autónoma de Tamaulipas en el 2011.

Experiencia Profesional: Maestro de Horario libre en la Universidad Autónoma de Tamaulipas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia desde 2015, asesor de una tesis de licenciatura, tres artículos publicados en revistas indexadas.

***In Vitro* and *In Vivo* Antiparasitic Efficacy of Praziquantel
against Monogenean *Ligictaluridus floridanus* in Channel
Catfish (*Ictalurus punctatus*)**

Flaviano Benavides-González^{1*} Ricardo A Gómez-Flores¹ Jesús G Sánchez-Martínez²

Jaime L Rábago-Castro² Isidro O Montelongo-Alfaro²

Abstract

Gill monogenean *Ligictaluridus floridanus* is the most common parasite on cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Tamaulipas, Mexico, affecting fish growth and possibly promoting secondary infections. In aquaculture, treatments against fish parasites include the use of chemotherapeutic agents to control and prevent diseases. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* efficacy of praziquantel baths against *L. floridanus* on *I. punctatus*. *In vitro* experiments evaluated *L. floridanus* attached and unattached to gills; for this, parasites were exposed to 2, 5, and 10 mg L⁻¹ of praziquantel in distilled or fish aquarium water, and saline solution. For the *in vivo* experiments, channel catfish infected with *L. floridanus* were separated into two groups; fish of the treatment group received three 90-min baths with praziquantel (10 mg L⁻¹) at 72 h intervals. Parasite prevalence, mean intensity, and abundance were assessed by gill examination. *In vitro* results of the praziquantel in saline and distilled water showed that it reduced the time needed for parasite elimination ($p < 0.05$); whereas no difference was observed in the aquarium water, as compared with the control group. *In vivo* results showed a reduction in the prevalence and mean intensity of the parasite, and a significant reduction ($p < 0.05$) in the parasite abundance in the treated fish. Consequently, the present study shows that praziquantel is an effective chemotherapeutant against the ectoparasite *L. floridanus*, significantly reducing its abundance.

Keywords: anthelmintics, catfish, monogenean, trematode

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México. Z. C.

² Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Norberto Treviño Zapata, Km 5, Carretera Victoria-Mante, Cd. Victoria, Tamaulipas 87000, México. Z. C.

*Correspondence: flaben85@hotmail.com

Introduction

Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, is an important aquaculture species in some regions of the world. In Mexico, intensive cage culture system production promotes crowd and in consequence transmission of ectoparasites. *Ligistilurus floridanus* is a monogenean, distributed in wild fish in North America (Rosas-Valdez and Pérez-Ponce de León, 2005). In Tamaulipas, this parasite shows the highest prevalence in cage-cultured catfish (Rábago-Castro et al., 2011). Praziquantel (Pzq) is a wide-spectrum isoquinolone that causes paralysis in flukes and integument damage; it is used against parasites, and is effective against monogeneans in immersion baths (KiHong and JaeBum 2000; Del Rio-Zaragoza et al., 2011). Studies *in vitro* have shown that Pzq has advantages compared with other anthelmintics (Hardy-Smith et al., 2012), when it has been used in different dosages (2-20 mg L⁻¹) according to the species and parasite infection (Buchmann 1988; KiHong and JaeBum, 2000; Stephens et al., 2003; Buchmann et al., 2011). However, there are few *in vivo* studies of this product on fish ectoparasites. The present study was undertaken to evaluate the anthelmintic effect of Pzq against *L. floridanus* in channel catfish, *I. punctatus*, juveniles under laboratory conditions on *in vitro* and *in vivo* experiments.

Materials and Methods

The *in vitro* experiment was done according to Hirazawa et al. (2000), with slight modifications. Three Pzq (Cisticid®, Merck SA de CV, Mex.) solutions were prepared at 2, 5 and 10 mg L⁻¹. Each Cisticid® tablet and powder was weighed to ensure that correct Pzq dosage was used. Saline solution (0.65%) (SS) (Jiménez-Guzmán et al., 1988), aquarium water (AW) and distilled water (DW) were used as diluents. Effect of each solution against parasite was compared in triplicate. Parasites were obtained from naturally infected *I. punctatus* from a local hatchery (Abasolo, México). Mean weight and mean fork length of the fish were 31.87 ± 3.98 g and 14.40 ± 0.50 cm, respectively. The fish were euthanized by cranial puncture and excised gill archs infected with more than five *L. floridanus* per gill arch were immersed in 50 ml each of the Pzq solutions and the control solutions at 22°C. Effectiveness of the Pzq and control solutions was

determined by the time taken to kill the parasites observed under a stereomicroscope (Carl Zeiss®, Stemi 2000-C; Germany).

The *in vivo* challenge was performed according to Silveira-Coffigny (2006), with slight modifications. Twenty-three juvenile catfish, clinically healthy, but naturally infected with *L. floridanus*, were obtained from the same hatchery and transported to the laboratory. The fish had a mean weight of 27.24 ± 2.04 g and a mean fork length of 13.30 ± 0.86 cm. They were stocked in an 80 L glass fiber tank, with aeration supplied by a blower and a continuous flow of water supplied from a ground well. Five fish samples were taken to confirm the parasite infection. The fish were anesthetized with benzocaine (40 mg L⁻¹) and were euthanized by cranial puncture. Infection with the parasite and identification were confirmed according to Hoffman (1985); results showed a mean of 2.5 ± 1.0 parasites per gill arch. The remaining catfish were randomly divided into six aquaria (40 L volume) for control and treated groups, each with three replicates containing three fish in each. The aquaria were filled with 37 L of water and a constant flow (18 L h⁻¹) was maintained.

The fish were acclimated for 4 days. At the beginning of the treatment, the water flow in the control and treated aquaria was interrupted, reducing the volume of water to 10 L in the aquaria; 100 mg of Pzq diluted in water (100 ml) were added to the water in the treated aquaria to reach a concentration of 10 mg L⁻¹. Three bath treatments for 3 h each were carried out with 72 h intervals in between. During treatments the internal walls of treated aquaria were cleaned with paper towels to ensure that no *L. floridanus* eggs remained, and the aeration was diminished to avoid eggs sticking to the walls. Additionally the walls were washed with the Pzq solution (10 mg L⁻¹). The same management of reduction in water level and wall cleaning was performed with the water in control aquaria. After 3 h of treatment, water levels were returned to the initial volume (37 L). The fish were fed twice a day *ad libitum* with 3 mm commercial catfish food (32% protein). Twenty-four hours after the last bath treatment, the fish were anesthetized and euthanized as described above. Four gill arches of the left side of each fish were examined for prevalence, mean intensity and abundance of *L. floridanus* under a stereomicroscope by placing them on Petri dishes containing 0.65% saline solution.

Table 1 Mean of total number of *Ligistilurus floridanus* per gill arch counted 24 h after the third praziquantel bath in control and treated groups.

Aquarium	Group	Fish number			Aquarium mean*
		1	2	3	
A	Treated	0	0	0	0 ^a
B	Control	3 ± 0.81	4.5 ± 1.91	0.75 ± 0.95	2.75 ± 1.89 ^b
C	Treated	1 ± 0.81	0.5 ± 0.57	0.5 ± 0.57	0.67 ± 0.29 ^a
D	Control	6.25 ± 3.59	33.25 ± 19.70	21.25 ± 8.13	20.25 ± 13.50 ^b
E	Control	4.25 ± 2.63	8.5 ± 3.69	4 ± 2.30	5.58 ± 2.53 ^b
F	Treated	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	1.25 ± 1.89	0.58 ± 0.58 ^a

*Differences between groups in the column are indicated by different letters ($p < 0.05$)

Table 2 Mean \pm SD of survival time expressed in seconds of *Ligistaluridus floridanus* on gill arch immersed in praziquantel (Pzq) prepared solutions using saline solution (0.65%), distilled water and aquarium water as diluents.

Group	Gill arch 1	Gill arch 2	Gill arch 3
Saline Sol. (SS) (0.65%)	661.88 \pm 169.47	675.55 \pm 19.17	864.29 \pm 144.75
2 mgL ⁻¹ Pzq (SS)	549.33 \pm 93.96	645.22 \pm 115.99	574.00 \pm 152.78
5 mgL ⁻¹ Pzq (SS)	502.40 \pm 229.32	448.36 \pm 136.45	353.09 \pm 102.39
10 mgL ⁻¹ Pzq (SS)	244.00 \pm 198.67	328.17 \pm 116.82	381.38 \pm 107.26
Distilled Water (DW)	3000.50 \pm 833.97	3419.00 \pm 859.55	3071.17 \pm 1198.37
2 mgL ⁻¹ Pzq (DW)	2389.00 \pm 183.21	2387.00 \pm 696.58	1880.50 \pm 232.76
5 mgL ⁻¹ Pzq (DW)	890.50 \pm 243.02	1273.63 \pm 414.22	692.50 \pm 116.61
10 mgL ⁻¹ Pzq (DW)	1370.20 \pm 627.48	923.00 \pm 854.17	1338.80 \pm 596.07
Aquarium Water (AW)	6039.00 \pm 1034.95	5390.82 \pm 907.72	5742.29 \pm 182.87
2 mgL ⁻¹ Pzq (AW)	3295.11 \pm 818.16	3214.86 \pm 849.32	6061.50 \pm 439.75
5 mgL ⁻¹ Pzq (AW)	2413.43 \pm 1244.07	2099.89 \pm 835.99	2674.86 \pm 1544.68
10 mgL ⁻¹ Pzq (AW)	1408.60 \pm 1422.13	3463.43 \pm 1941.51	3466.60 \pm 852.38

Data for *in vitro* trials were analyzed with a non-parametric Kaplan-Meier cumulative proportion surviving test, grouped by control and treatment Pzq dosages in different trials. In addition, data obtained from each challenge of survival of each parasite were analyzed under ANOVA test. Data where DW and AW were used needed Sin transformation to meet ANOVA assumptions, whereas SS data did not need transformation. For the *in vivo* experiment, prevalence, mean intensity and abundance of *L. floridanus* were obtained according to Bush et al. (1997) and Mladineo (2005), where the mean number of parasites per gill arch was obtained, and data were evaluated by ANOVA. Additionally, data were transformed to Log¹⁰ to meet ANOVA assumptions. All data were analyzed using the commercial software Statistica® v6.1 (StatSoft®, Inc., USA) using $\alpha=0.05$ and $\alpha=0.02$, as levels of significance.

Results and Discussion

Praziquantel seems to be an effective anthelmintic drug suitable to be used as a control agent (Martin et al., 1997). A noticeable effect of Pzq on survival time of parasites was observed during the *in vitro* trial (Table 2, Fig 2); parasites were commonly released from the gills, before they stopped moving. Parasites which received 10 mg L⁻¹ of Pzq diluted in SS, contracted (curved shape) almost immediately; this was not observed during the DW and AW treatments. Hirazawa et al. (2000) also reported helminth contraction on *in vitro* trials with 20 mg L⁻¹ of Pzq, using filtered sea water as diluent. Schelkle et al. (2011) also

reported salt parasite treatments affecting monogeneans in guppies (*Poecilia reticulata*), using up to 33 g L⁻¹ and decreasing parasite survival time to less than 1 h causing osmoregulation disruption.

Survival time of *L. floridanus* on SS (Table 2) showed a significant difference ($p<0.05$) between the groups (Fig 1a); the control and 2 mgL⁻¹ groups had a higher difference ($p<0.02$) compared with the other groups. Death of parasite gill arch populations in the control groups and in the groups treated with Pzq fit into a normal distribution, in which almost 40% of total parasite counted died in a short period of time close to survival time mean. Parasites exposed to AW had a longer survival time than parasites exposed to the other solutions (Figs 2, 3). The Kaplan-Meier analysis showed differences among the treatment and control groups (Fig 3). Parasites in the control and 2 mg L⁻¹ groups began to die at very different times, whereas in the 5 and 10 mg L⁻¹ groups, almost 20% of all parasites died in less than 100 sec.

The parasite prevalence of the control and treated groups on *in vivo* trial was 100% and 66.6%, respectively, whereas the parasite mean intensity among the control and treated groups were 76.22 and 5.0, respectively. Moreover, the parasite abundance in the control group was higher than the Pzq group, 76.22 and 3.33, respectively. The mean of parasites per gill arch showed significant differences ($p<0.05$) between the control and treated groups (Table 1). Log10 data also showed significant differences ($p=0.02$) between the control and treated groups (Fig 1b). Advantages of Pzq include its use in the control of internal parasites in channel catfish because it has good absorption

through epitheliums, evidenced by the reduction in the trematode larvae after bath treatments (Plumb and Rogers, 1990). However, establishing a proper lethal dose is also required to minimize potential development of Pzq resistance caused by exposure of parasite to sub-lethal doses. Future research of treatments on different *L. floridanus* stages is also needed due to the fact that certain kinds of immature monogeneans show resistance to Pzq, such as *Pseudodactylogyrus bini* (Buchmann, 1988b). In

conclusion, Pzq showed anthelmintic action, being able to kill *L. floridanus* on catfish gills and increasing its killing potential when mixed with SS. However, DW and AW could decrease its potential. Therefore, Pzq is recommended for the control or treatment of ectoparasites. Further studies will focused on timing of Pzq administration and water quality effects on its efficacy.

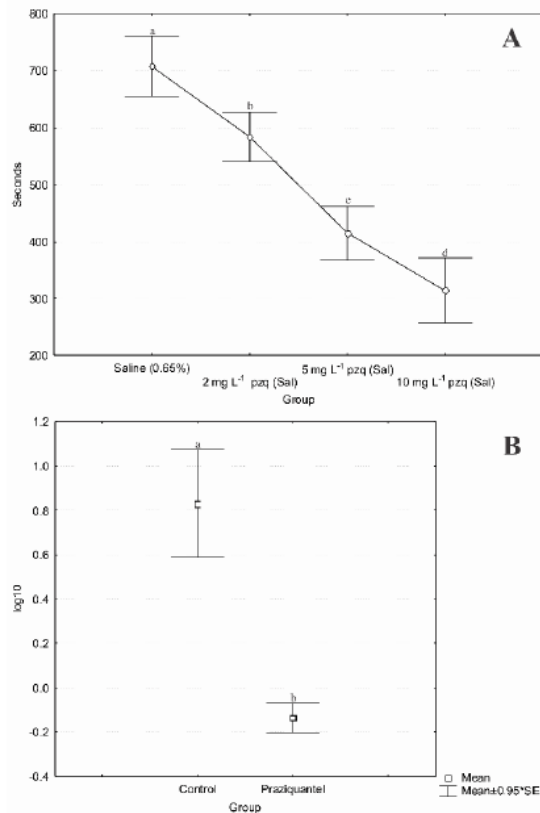


Figure 1 Differences ($p < 0.05$) of *L. floridanus*, indicated by different letters between groups, when 10 mg L⁻¹ of praziquantel were administered. (A) Mean of survival time expressed in seconds of *Ligistaluridus floridanus* per gill arch on saline and praziquantel groups on *in vitro* trial. Vertical bars denote 0.95 confidence. (B) Mean of total number of *Ligistaluridus floridanus* per gill arch of *in vivo* challenge, counted 24 h after treatments, in control and 10 mg L⁻¹ praziquantel-treated groups. Data are Log10 mean \pm SE. N=3 in each group.

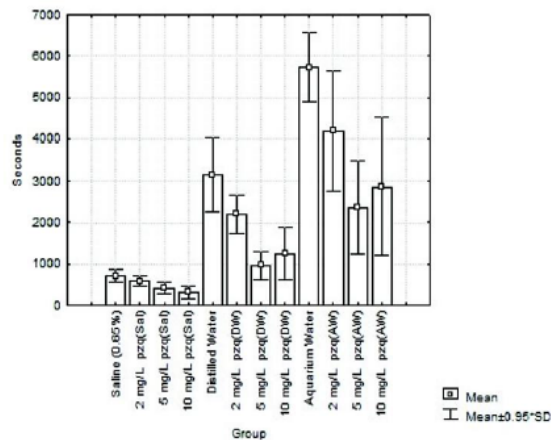


Figure 2 Comparison graph of survival time of *Ligistaluridus floridanus* on gill arch exposed to saline solution (0.65%), distilled water and aquarium water as diluents. Data are mean \pm SD. Pzq (Sal) represents praziquantel treatment diluted in saline solutions; pzo (DW) represents praziquantel treatment diluted in distilled water and pzo (AW) represents praziquantel treatment diluted in aquarium water.

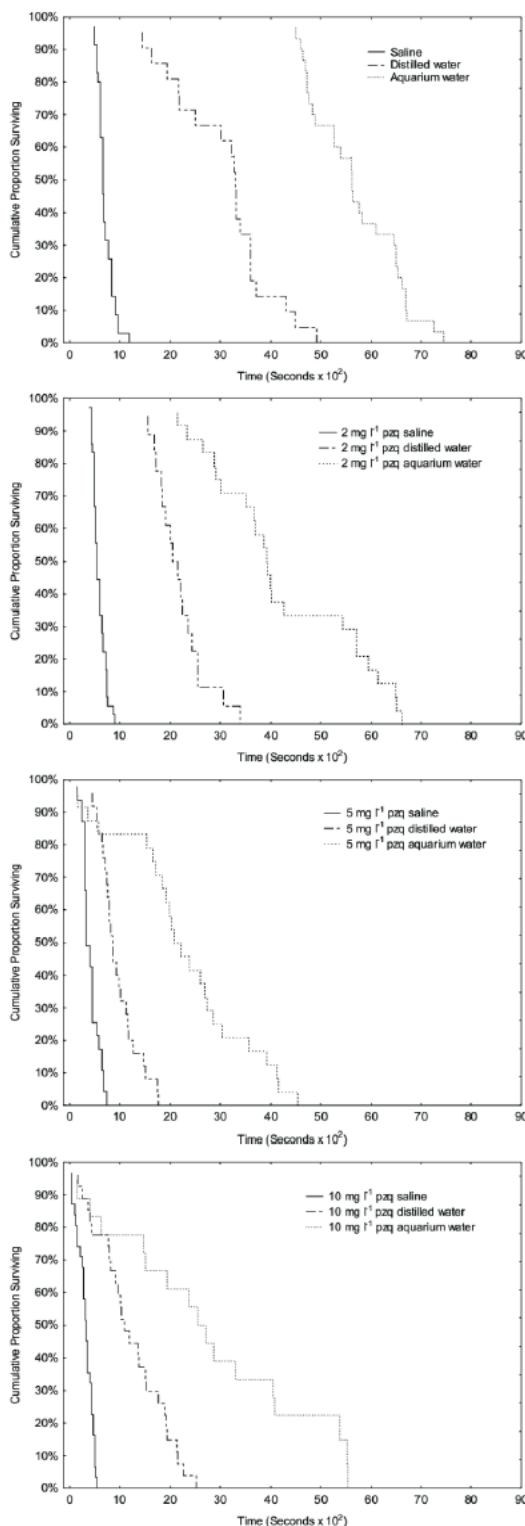


Figure 3 Comparison of survival time seconds of *Ligistaluridus floridanus* per gill arch, using Kaplan-Meier cumulative proportion surviving test on *in vitro* experiment.

Acknowledgements

We would like to thank farm Acuacultura Faz Mora, Abasolo, Tamaulipas, who donated the fish for this study, and to CONACYT, Mexico for the Ph.D. scholarship to FBG.

References

- Buchmann K 1988^a. Epidemiology of pseudodactylogyrosis in an intensive eel-culture system. *Dis Aquat Org*. 5: 81-85.
- Buchmann K 1988^b. Temperature-dependent reproduction and survival of *Pseudodactylogyris bini* (Monogenea) on the European eel (*Anguilla anguilla*). *Parasitol Res*. 75: 162-164.
- Buchmann K, Kania PW, Neumann L and De'Besi G 2011. Pseudodactylogyrosis in *Anguilla anguilla* (Actinopterygii: Anguilliformes: Anguillidae): change of control strategies due to occurrence of anthelmintic resistance. *AI & P*. 41(2): 105-108.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotzand JM and Shostak AW 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol*. 83(4): 575-583.
- Del Rio-Zaragoza OB, Fajer-Ávila EJ and Almazán-Rueda P 2011. Influence of β -glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans. *Parasite Immunol*. 33(9): 483-494.
- Hardy-Smith P, Ellis D, Humphrey J, Evans M, Evans D, Rough K, Valdenegro V and Nowak B 2012. *In vitro* and *in vivo* efficacy of anthelmintic compounds against blood fluke *Cardicola forsteri*. *Aquaculture* 334-337: 39-44.
- Hirazawa N, Ohtaka T and Hata K 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*. 188(1-2): 1-13.
- Hoffman GL 1985. Worm Parasites (Helmints and Leeches). In: *Principal Diseases of Farm Raised Catfish* JA Plumb (ed.) Auburn, Alabama 35-49.
- Jiménez-Guzmán F, Galaviz-Silva L, Segovia-Salinas F, Garza-Fernández H and Wesche-Ebeling P 1988. *Parásitos y enfermedades del bagre (Ictalurus spp.)*. (In Spanish). Mexico, D. F.: Secret. Pesca 138pp.
- KiHong K and JaeBum C 2000. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage simulating commercial rockfish *Sebastes schlegelii* culture conditions. *Dis Aquat Organ*. 40(3): 229-231.
- Martin RJ, Robertson AP and Bjorn H 1997. Target sites of anthelmintics. *Parasitology* 114(7): 111-124.
- Mladineo I 2005. Parasite communities of Adriatic cage-reared fish. *Dis Aquat Org*. 64(1): 77-83.
- Plumb JA and Rogers WA 1990. Effect of Droncit (praziquantel) on yellow grubs *Clinostomum marginatum* and eye flukes *Diplostomum spathaceum* in channel catfish *J Aquat Anim Health*. 2(3): 204-206.
- Rábago-Castro J, Sánchez-Martínez JG, Loredó-Osti J, Gómez-Flores R, Tamez-Guerra P and Ramírez-Pfeiffer C 2011. Temporal and spatial variations

- of ectoparasites on cage-reared channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in Tamaulipas, Mexico. J World Aquac Soc. 42(3): 406-411.
- Rosas-Valdez R and Pérez-Ponce de León G 2005. Biogeografía histórica de helmintos parásitos de ictalúridos en América del Norte: Una hipótesis preliminar utilizando el método panbiogeográfico. In: Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines: Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XIII CYTED). EJ Llorente and JJ Morrone (ed) México, DF: Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. 217-226.
- Schelkle B, Doetjes R and Cable J 2011. The salt myth revealed: Treatment of gyrodactylid infections on ornamental guppies, *Poecilia reticulata*. Aquaculture. 311(1-4): 74-79.
- Silveira-Coffigny R 2006. Los productos fitofarmacéuticos en la acuicultura (The phyto-pharmaceuticals products in aquaculture). REDVET. 7(8): 1-10.
- Stephens FJ, Cleary JJ, Jenkins G, Jones JB, Raidal SR and Thomas JB 2003. Treatments to control *Haliotrema abaddon* in the West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum*. Aquaculture. 215(1-4): 1-10.

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อปรสิตของพราซิควอนเทล *in vitro* และ *in vivo* ต่อพยาธิ monogenean ชนิด *Ligictaluridus floridanus* ในปลาตุ๊กอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*)

Flaviano Benavides-González^{1*} Ricardo A Gómez-Flores¹ Jesús G Sánchez-Martínez²
Jaime L Rábago-Castro² Isidro O Montelongo-Alfaro²

พยาธิตัวแบน monogenean ชนิด *Ligictaluridus floridanus* เป็นปรสิตที่พบได้บ่อยที่สุดในปลาตุ๊กอเมริกันในการเพาะเลี้ยง (*Ictalurus punctatus*) ในเมือง Tamaulipas ประเทศเม็กซิโก โดยมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลา และอาจเสริมต่อการติดเชื้อแทรกซ้อน ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การรักษารัสต์ในปลาที่มีการใช้ยาเคมีบำบัดในการควบคุมและป้องกันโรค วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการอาบพราซิควอนเทล *in vitro* และ *in vivo* ต้าน *L. floridanus* บนปลา *I. punctatus* ในการทดลอง *in vitro* ได้มีการประเมิน *L. floridanus* ที่เกาะอยู่บนเหงือกและที่หลุดจากเหงือก เชื้อปรสิตได้สัมผัสกับพราซิควอนเทล 2, 5 และ 10 มก./ลิตรของน้ำกลั่นหรือน้ำจากฟิสิทิกซ์ปลาและน้ำเกลือ สำหรับการทดลอง *in vitro* ปลาตุ๊กอเมริกันที่ติดเชื้อ *L. floridanus* ได้ถูกแยกเป็น 2 กลุ่ม ปลาในกลุ่มทดลองได้รับการอาบด้วยพราซิควอนเทล (10 มก./ลิตร) เป็นเวลา 90 นาที 3 ครั้ง โดยห่างกัน 72 ชั่วโมง ความชุก ความเข้มเฉลี่ย และความมากมายของปรสิตถูกประเมินโดยการตรวจเหงือก ผลการทดลอง *in vitro* ของพราซิควอนเทลในน้ำเกลือและน้ำกลั่นแสดงให้เห็นว่ายาได้ลดเวลาที่ใช้ในการกำจัดเชื้อปรสิต ($p < 0.05$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างในน้ำจากฟิสิทิกซ์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลอง *in vivo* ได้แสดงให้เห็นว่าการลดลงของความชุกและความเข้มเฉลี่ยของเชื้อปรสิต และการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของความมากมายของเชื้อในปลาที่ได้รับการรักษา ดังนั้น การศึกษานี้แสดงว่าพราซิควอนเทลเป็นสารเคมีบำบัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านปรสิตภายนอกชนิด *L. floridanus* โดยสามารถลดความอุดมของเชื้อลงได้

คำสำคัญ: ยาด้านพยาธิ ปลาตุ๊ก monogenean พยาธิใบไม้

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Pedro de Alba s/n, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León 66450, México. Z. C.

² Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Norberto Treviño Zapata, Km 5, Carretera Victoria-Mante, Cd. Victoria, Tamaulipas 87000, México. Z. C.

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: flaben85@hotmail.com

Artículo aceptado

Dear Dr. Rábago-Castro,

I am pleased to inform you that your manuscript Effects of Hydrogen Peroxide and Metrifonate on Monogenean *Ligictaluridus floridanus* on Catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) Gills has been accepted for publication in the Journal of Parasitology. Your manuscript will appear in the next available issue. Your manuscript 15-791R1 can be considered published. It will be available online at the Journal's website and at PubMed within the next few days.

The authors have done a good job of responding to the reviews. Although some attention to language is still needed (see editor's changes), I believe that the major points of contention have been resolved. I thank the authors for their efforts to improve the manuscript.

Please take the time to carefully look at your Article File and make certain that this is the correct version of your manuscript. If you should notice any typographical errors/changes that need to be made then email them to us, and Vickie will try to incorporate them before officially sending to Allen Press for publication.

Thank you for your contribution to our Journal. If you have any questions, feel free to contact me.

Sincerely,

Michael V. K. Sukhdeo
Editor
Journal of Parasitology

Cita electrónica PubMed

Benavides-González, F., Gomez-Flores, R. A., Rábago-Castro, J. L., Sánchez-Martínez, J. G., & Montelongo-Alfaro, I. O. (2015). Effects of Hydrogen Peroxide and Metrifonate on Monogenean *Ligictaluridus floridanus* on Catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) Gills. Journal of Parasitology.